ANNÉE SCOLAIRE
1970-1971
N° d'Ordre : 4

THÈSES

PRÉSENTÉES

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

PAR

Cécile CHAPARD
PHARMACIEN
C.E.S. de contrôle physico-chimique des médicaments
C.E.S. de pharmacodynamie et essais biologiques des médicaments
C.E.S. de chimie organique, de chimie générale I et de physiologie animale
Maître-Assistant de Chimie Organique à la Faculté de Pharmacie
Université de Bordeaux II.
née le 19 Octobre 1941 à PÉRIGUEUX (Dordogne)

1ère Thèse : Étude chimique et analytique de quelques essences terpéniques oxydées. Contrôle physico-chimique des médicaments qui en dérivent.

2ème Thèse : Le dichroïsme circulaire - Ses applications analytiques

Présentées et Soutenues publiquement le lundi 7 Juin 1971
devant la Commission d'Examen

MM. P. MESNARD, Professeur . . . . . PRÉSIDENT
R. GOLSE, Professeur . . . . . }
R. CROCKETT, Professeur . . . . . } EXAMINATEURS
G. DEVAUX, Professeur . . . . . }
J. JOUANY, Maître de Conférences agrégé à l'Université de Nancy I . . . }

ANNÉE SCOLAIRE
1970-1971
N° d'Ordre : 4

THÈSES

PRÉSENTÉES

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

PAR

Cécile CHAPARD
PHARMACIEN
C.E.S. de contrôle physico-chimique des médicaments
C.E.S. de pharmacodynamie et essais biologiques des médicaments
C.E.S. de chimie organique, de chimie générale I et de physiologie animale
Maître-Assistant de Chimie Organique à la Faculté de Pharmacie
Université de Bordeaux II.
née le 19 Octobre 1941 à PÉRIGUEUX (Dordogne)

1ere Thèse : Étude chimique et analytique de quelques essences terpéniques oxydées. Contrôle physico-chimique des médicaments qui en dérivent.

2eme Thèse : Le dichroïsme circulaire - Ses applications analytiques

Présentées et Soutenues publiquement le lundi 7 Juin 1971
devant la Commission d'Examen

MM.	P. MESNARD, Professeur	PRÉSIDENT
	R. GOLSE, Professeur	EXAMINATEURS
	R. CROCKETT, Professeur	
	G. DEVAUX, Professeur	
	J. JOUANY, Maître de Conférences agrégé à l'Université de Nancy I	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MA FAMILLE

Avec toute mon affection.

A MES AMIS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543911_0045

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur J.M. JOUANY

Maître de Conférences agrégé à l'Université de NANCY I

Nous sommes très sensible à l'intérêt que vous avez manifesté pour notre travail en acceptant de siéger parmi nos juges ; nous vous en remercions très vivement.

Monsieur le Professeur G. DEVAUX

Professeur sans Chaire (Pharmacie chimique)

Nous avons eu l'occasion d'apprécier la compréhension que vous avez toujours montrée à notre égard et les encouragements que vous nous avez prodigués en plusieurs occasions.
Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

Monsieur le Professeur R. CROCKETT

Professeur de Biochimie pharmaceutique
Assistant de Biochimie des Hôpitaux de Bordeaux

Vous nous avez toujours donné des preuves d'intérêt et souvent apporté une aide précieuse par vos conseils judicieux.
Nous vous assurons de notre vive gratitude.

Monsieur le Professeur R. GOLSE

Professeur de Chimie générale et minérale
Docteur ès Sciences physiques
Pharmacien des Hôpitaux
Officier des Palmes académiques

Nous avons été très touchée par l'accueil bienveillant que vous nous avez toujours réservé; nous vous prions de trouver ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur P. MESNARD

Professeur de Chimie Organique et Analytique
Membre correspondant de l'Académie de Pharmacie
Docteur ès Sciences physiques
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Ordre National du Mérite
Officier des Palmes académiques
Chevalier de la Santé publique
Membre correspondant de la Réal Académia de Farmacia de Madrid
Membre d'Honneur de la Société de Pharmacie de Benares (Inde)

Depuis six ans, vous nous faites l'honneur de nous compter parmi vos proches collaborateurs et nous bénéficions chaque jour de l'étendue de vos connaissances et de la rigueur de votre enseignement.

Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez toujours accordée dans notre travail, et de celle que vous nous avez témoignée en nous inspirant ce sujet de thèse.

Vous nous avez toujours accueillie avec bienveillance et compréhension ; vos conseils et vos encouragements nous ont permis de mener à bien cette thèse.

Permettez-nous de vous exprimer ici l'expression de notre reconnaissance, et l'assurance de notre profond dévouement.

ETUDE CHIMIQUE ET ANALYTIQUE DE QUELQUES ESSENCES TERPENIQUES OXYDEES

CONTROLE PHYSICO-CHIMIQUE DES MEDICAMENTS QUI EN DERIVENT

Travail du Laboratoire de Chimie Organique
et de Contrôle physico-chimique des Médicaments
de l'Université de Bordeaux II

(Professeur Pierre MESNARD)

AVANT - PROPOS

Avant d'exposer les résultats de notre travail, nous tenons à exprimer nos remerciements à tous ceux qui nous ont aidée à le mener à bien.

Nous remercions le Docteur TRARIEUX qui a mis au point le procédé de préparation des dérivés oxydés hémisynthétiques des essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus et a bien voulu nous faire bénéficier des résultats de ses propres travaux.

Monsieur le Professeur DULONG de ROSNAY nous a permis d'effectuer une partie de notre expérimentation dans son Service ; nous lui en sommes très reconnaissante.

Nous remercions aussi Monsieur le Professeur BERTUCAT pour les conseils et les encouragements qu'il nous a souvent donnés.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude à Mademoiselle L. CHASSAING qui nous a beaucoup aidée en nous traduisant de nombreux articles en langue étrangère.

Les Laboratoires ROSA-PHYTOPHARMA ont obligeamment mis à notre disposition de nombreux produits nécessaires à nos recherches ; nous les en remercions bien vivement.

Toute l'équipe du Laboratoire nous a facilité la tâche avec compréhension. Que tous soient ici sincèrement remerciés.

I N T R O D U C T I O N

La thérapeutique utilise depuis fort longtemps les huiles essentielles de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus pour leurs propriétés balsamiques, décongestionnantes et antiseptiques dans les affections des voies respiratoires.

C'est ainsi que l'essence d'eucalyptus est connue depuis 1865 comme agent désinfectant des bronches, sédatif de la toux et fluidifiant l'expectoration.

Leur emploi est cependant limité par leur insolubilité dans l'eau et leur mauvaise absorption par les muqueuses.

On a constaté par ailleurs que les essences vieillies sont plus actives que les essences récemment distillées. Cette observation va de pair avec l'autoxydation à l'air, aboutissant à différents dérivés d'oxydation, après formation intermédiaire de peroxydes dont les propriétés irritantes et caustiques pourraient expliquer les inconvénients observés lors des injections intra musculaires des essences elles-mêmes.

Ces dérivés étant, contrairement aux essences, hydrosolubles, l'utilisation en thérapeutique est favorisée.

Les chercheurs ont été amenés à provoquer leur formation, puis à les séparer par distillation fractionnée (77), réalisant ainsi une hémisynthèse des dérivés oxydés d'huiles essentielles dont l'activité pharmacodynamique se trouve exaltée par rapport aux produits d'origine, et que leur hydrosolubilité rend utilisables par voie parentérale.

Parmi eux, les dérivés des huiles essentielles de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus sont depuis quelque temps utilisés en thérapeutique (*). Ce sont eux que nous nous sommes proposée d'étudier.

(*) *Les dérivés oxydés hémisynthétique des essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus entrent dans la composition de formes médicamenteuses exploitées par les Laboratoires ROSA-PHYTOPHARMA à 93-PANTIN, sous la dénomination TERPONE.*

Nous envisagerons d'abord au point de vue chimique, les essences de départ et les produits obtenus après oxydation ; nous discuterons également l'oxydation de quelques carbures terpéniques. Nous procèderons ensuite à une étude analytique dans le but de différencier les essences et les dérivés oxydés. Nous appliquerons enfin nos résultats au contrôle des médicaments à base d'essences oxydées.

PREMIERE PARTIE

OXYDATION DES ESSENCES ET DE QUELQUES CARBURES TERPENIQUES

Après un bref rappel sur la composition des essences d'origine, nous décrirons le mode de préparation de leurs dérivés oxydés, ainsi que de dérivés oxydés de Carbures terpiniques. Avant de procéder à l'étude analytique qui fera l'objet de la deuxième partie, il nous a paru opportun de discuter la nature et le mode de formation des composés qui prennent naissance au cours de l'oxydation en série terpénique.

---°---

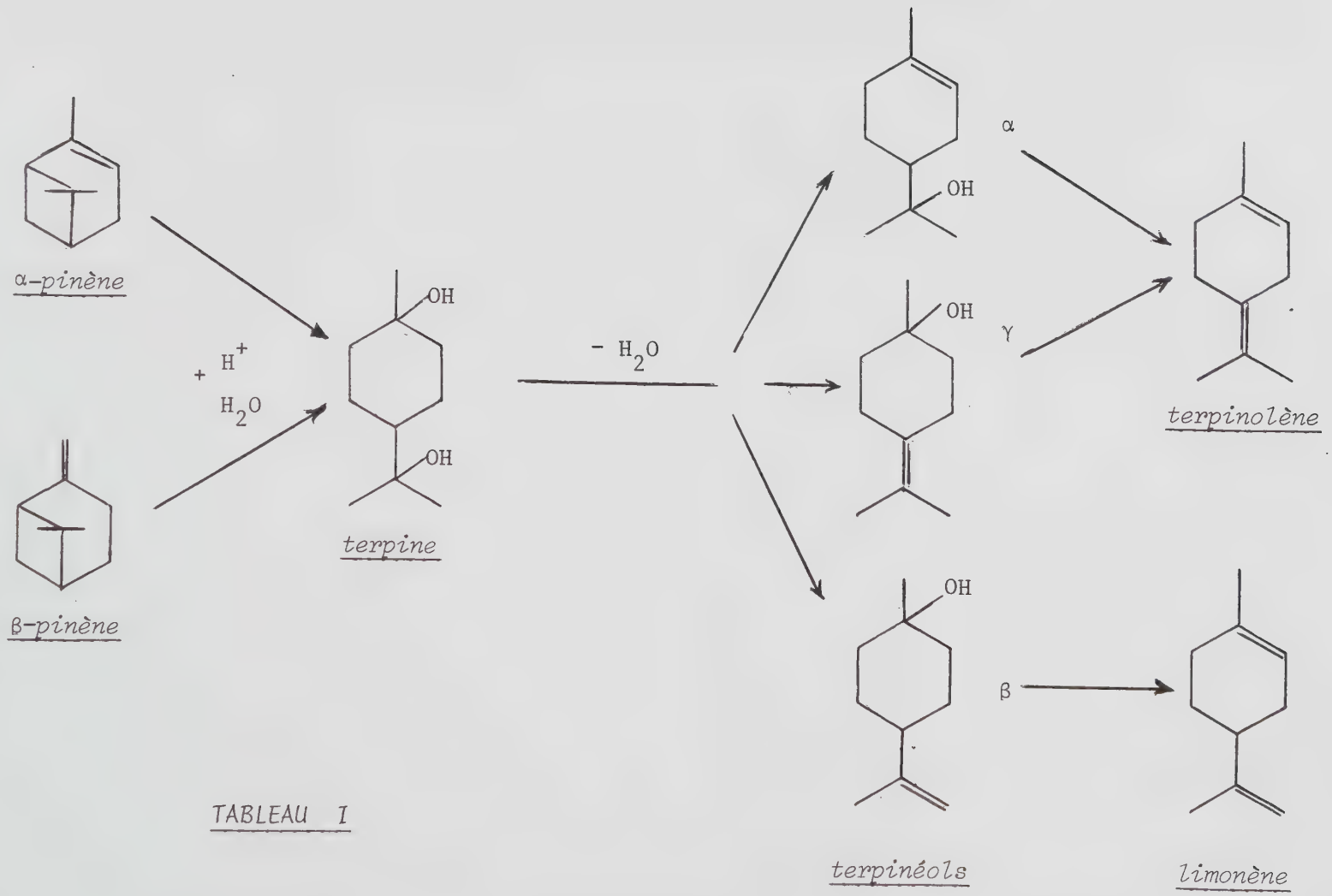

α-pinène
β-pinène
+ H+
H2O
OH
OH
terpine
- H2O
OH
OH
OH
α
γ
β
terpinolène
terpinéols
limonène

TABLEAU I

Chapitre I

ESSENCES DE PIN, DE NIAOULI ET D'EUCALYPTUS

I. ESSENCE DE PIN (13, 34).

L'essence de pin est obtenue à partir de l'essence de térébenthine du pin des Landes (Pinus Pinaster, Solander, *Conifères);* par chauffage en présence d'un excès d'ions H^+, celle-ci est d'abord hydratée avec formation de terpine ; par deshydratation ultérieure il se forme des terpinéols, du terpinolène et du limonène. Le mélange obtenu, après séparation des terpinéols, constitue l'essence de pin. (tableau I).

CARACTERES :

C'est un liquide incolore ou très légèrement coloré en jaune, d'odeur aromatique, et présentant les caractère physiques suivants :

Solubilité : miscible en toutes proportions à l'alcool à 95 C, 80 C, 70 C ; donne une solution limpide avec 25 fois son volume de CS_2 ; insoluble dans l'eau.

Densité : à 20°C : $d\,{}^{20}_{20} = 0,87 - {}^{20}_{20}\,0,89$

Indice de réfraction à 20°C : $n_D^{20} = 1,469.$

Pouvoir rotatoire : le pouvoir rotatoire est très faible ou nul ; examiné à 20°C dans un tube de 2 dm, elle donne une déviation polarimétrique comprise entre - 1°,5 et 0°.

Température de distillation : à la pression ordinaire, elle distille entre 169°C et 200°C (le terpinéol, mélange des trois isomères, distille dans les mêmes conditions entre 210°C et 215°C) ; sous 2 mm de mercure, elle fournit la totalité de son poids de distillat entre 45°C et 62°C, la quasi totalité étant passée à 57°C.

COMPOSITION.

L'essence de pin est essentiellement constituée par du p-cymène et des carbures terpéniques, myrcène, α et γ-terpinènes, terpinolène, (d + l) limonène ou dipentène, α et β-pinènes, Δ_3-carène, camphène.

II. ESSENCE DE NIAOULI (13, 34, 36).

L'essence de Niaouli est préparée par distillation à la vapeur des feuilles fraîches du Niaouli (Melaleuca viridiflora, Gaertner, *Myrtacées*).

Elle est inscrite à la pharmacopée Française (8ème Edition, 1965, p.428) et doit répondre aux essais qui y sont décrits.

COMPOSITION.

Cette essence est constituée principalement de dérivés terpéniques, carbures, α et β-pinènes, limonène, alcools parmi lesquels l'α-terpinéol, éther oxyde, eucalyptol (35-50 %). On y trouve également, un certain nombre d'aldéhydes et d'esters : aldéhydes butyrique, valérianique, benzoïque ; acétate, valérianate et butyrate de terpényle.

III. ESSENCE D'EUCALYPTUS (13,34).

L'essence d'eucalyptus est préparée par distillation à la vapeur des feuilles fraîches et des bourgeons floraux de l'eucalyptus (Eucalyptus Globulus, Labillardière *Myrtacées*).

Elle est inscrite à la Pharmacopée Française (8ème Edition 1965, p.422) et doit répondre aux essais qui y sont décrits.

COMPOSITION.

Cette essence est elle aussi constituée de dérivés terpéniques, carbures, α et β pinènes, camphène, alcools γ-terpinéol, pinocarvéol, myrténol, isobornéol, eudesmol (alcool sesquiterpénique), cétones, carvone, l-pinocarvone, d-verbenone.

Elle renferme également une forte proportion d'eucalyptol (70-80 %) ainsi que les adéhydes valérianique, butyrique, caproïque et de l'acétate d'isoamyle.

Les principales propriétés physiques de ces trois essences sont résumées dans le tableau III.

---°---

Chapitre II

DERIVES OXYDES HEMISYNTHETIQUES DES ESSENCES DE PIN, DE NIAOULI ET D'EUCALYPTUS

I. PREPARATION DES DERIVES OXYDES DES ESSENCES.

Les dérivés d'oxydation sont obtenus par la méthode décrite par R. TRARIEUX (76,77). Elle comporte deux stades séparés par un repos de 24 h.

1°. Oxydation, elle même divisée en deux phases :

- une phase de préoxydation,
- une phase d'oxydation proprement dite.

2°. Séparation des dérivés oxydés par distillation fractionnée.

I. PREMIER TEMPS : OXYDATION.

- *Principe :* l'oxydation est réalisée par un mélange d'air et d'oxygène en présence d'un catalyseur, l'abiétate de cobalt III, et de peroxydes fournis par une essence de térébenthine ancienne.

- *Technique :* l'oxydation s'effectue en deux temps, le premier à la température ambiante, et le deuxième entre 50-55°C et 100°C. Le catalyseur est introduit sous forme de plusieurs fractions séparées pendant le premier temps.

1° Phase : *préoxydation :* dans un récipient de deux litres comportant un tube d'arrivée de gaz effilé et plongeant jusqu'au fond, un tube de sortie de gaz et un agitateur, on introduit 1000 cm3 d'essence, 1,5 g d'abiétate cobaltique et 10 g d'essence de térébenthine vieillie titrant au moins 1 % de peroxydes. Par le tube d'arrivée de gaz, on introduit sous une pression de 1 kg/cm2 un mélange air-O_2 (90 % : 10 %) à la température ambiante.

On laisse le barbotage des petites bulles du mélange gazeux se poursuivre pendant 12 h en ajoutant de nouvelles fractions de 1,5 g d'abiétate cobaltique au bout de 2 h, 4 h, 6 h. Pendant cette opération, le liquide devient brun et sa température s'élève de 5 à 15°C. On laisse 24 h au repos.

2° Phase : *oxydation proprement dite :* après 24 h le liquide précédent est additionné de 2 g de catalyseur et agité vigoureusement par "tournage", pendant que l'on continue à faire passer le courant gazeux sous la même pression.

Cette opération est poursuivie jusqu'à ce que la chaleur dégagée par l'oxydation ait atteint la température à 95-100°C.

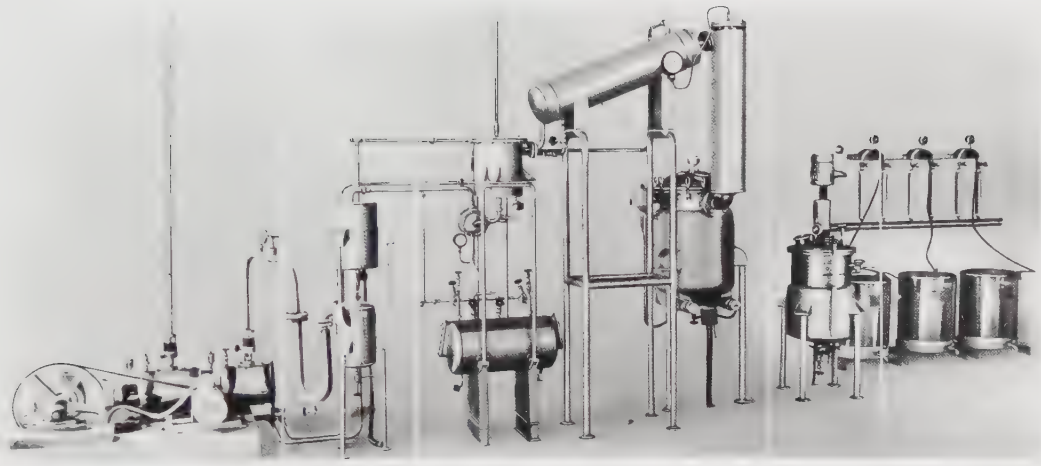
Le mélange réactionnel est ensuite laissé au repos 24 h à nouveau.

II. DEUXIEME TEMPS : SEPARATION DES DERIVES OXYDES :

- *Principe :* Les essences qui ont réagi sont séparées par distillation fractionnée sous pression réduite. On élimine ainsi en tête les parties non touchées par l'oxydation et en queue des polymères et goudrons indistillables dans les conditions opératoires.

- *Technique :* Le mélange réactionnel est introduit dans un appareil à distillation fractionnée muni d'une colonne de 0,75 m, à boules ou à plateaux, et de deux séparateurs.

Les températures de fractionnement varient en fonction de la qualité du vide.



Compresseur | *Filtrage et condenseur* | *Distillation fractionnée* | *Oxydation* | *Pré-oxydation*

FIGURE 1

Sous une pression de 2-4 mm de mercure, on isole les composés qui n'ont pas réagi.

entre 40/45°C et 62/63°C pour l'essence de Pin,
entre 40/45°C et 68/72°C pour les essences de Niaouli et d'Eucalyptus.
puis jusqu'à 120/130°C pour les produites d'oxydation.

L'ensemble des opérations de préoxydation, oxydation et distillation est réalisé à l'aide d'un appareillage schématisé (figure 1) (77).

III. OBSERVATIONS .

L'oxydation se passe dans des conditions différentes selon qu'il s'agit d'essence de Pin d'une part, d'essences de Niaouli et d'Eucalyptus d'autre part.

Lors de l'oxydation de l'essence de Pin par "tournage", la température de l'essence atteint 100°C au maximum.

Pour les essences de Niaouli et d'Eucalyptus, la température obtenue lors du "tournage" atteint 145°C. Pratiquement lors de la préparation des dérivés oxydés, on ne dépasse pas 130°.

Rendement :

Pour l'essence de Pin, le rendement en dérivés oxydés est de 20 % environ. Pour les deux autres essences il varie selon leur teneur en eucalyptol comme l'indiquent les résultats rassemblés dans le tableau II. (voir tableau II page suivante).

Essences	*Titre en Eucalyptol*	*Pourcentage de dérivés oxydés recueillis par rapport au volume d'origine*
Eucalyptus	10 % 20 % 40 % 70%(Codex)	10,5 % 8,5 % 5,3 % 3,3 %
Niaouli	10 % 20 % 30 % 50 %	12 % 9,6 % 11 % 6 %

Tableau II - Influence du titre en Eucalyptol des essences de Niaouli et d'Eucalyptus sur le rendement en dérivés oxydés de ces essences.

Les rendements en dérivés oxydés sont donc inversement proportionnels à la teneur des essences en Eucalyptol. On peut en conclure, en première approximation,que ce dernier n'est pas modifié par la méthode d'oxydation utilisée et que seuls les carbures conduisent à des dérivés oxydés.

II. PROPRIETES PHYSIQUES DES DERIVES OXYDES DES ESSENCES.

Les caractères physiques des produits obtenus sont très différents de ceux des essences d'origine (tableau III). (voir tableau III page suivante).

---°---

Essences de	Caractères Organoleptiques	Solubilité	d_{20}^{20}	n_D^{20}	α_D^{20}	Eb_{760}	T°C. DISTILLATION	
Pin	liquide incolore d'odeur aromatique	0	0,87-0,89	1,4692	-1,5°0°	+ 169°	(+169)-(+200°)C (+ 45)-(+ 57°)C	760 mmHg 2 mmHg
Niaouli	liquide jaune pâle, d'odeur aromatique	0	0,90-0,91	1,4610	(-3,3°)(+1°)	+ 175°	(+ 45)-(+ 65°) C	2 mmHg
Eucalyptus	liquide jaunâtre, d'odeur aromatique	0	0,90-0,91	1,4633	0 -(+10°)	+ 172°	(+ 45)-(+ 64°) C	2 mmHg
Pin oxydée	liquide huileux jaune d'or, d'odeur camphrée	3,32 p.1000	0,953	1,4886	0°	+ 194°	à partir de + 63° C.	2 mmHg
Niaouli oxydée	liquide huileux jaune orange, d'odeur camphrée	1,44 p.1000	0,941	1,4780	0°	+ 186°	à partir de + 70° C.	2 mmHg
Eucalyptus oxydée	liquide huileux jaune - citron, d'odeur camphrée	2,00 p.1000	0,934	1,4650	- 0,5°	+ 183°	à partir de + 70° C	2 mmHg

Tableau III - Caractères physiques comparés des essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus avant et après oxydation.

Chapitre III

PREPARATION DE QUELQUES DERIVES OXYDES DE CARBURES TERPENIQUES

Nous avons traité les dérivés oxydés de quelques carbures terpéniques suivantes :α-pinène, β-pinène, Δ_3-carène et camphène. L'oxydation et la distillation ont été effectuées en laboratoire dans les conditions précédemment décrites.

α et β- pinènes :

1°. La préoxydation est conduite selon la méthode habituelle par passage d'air enrichi en oxygène dans la proportion de 10 % et par petit bullage pendant 36 h en présence d'abiétate cobaltique.

2°. L'oxydation est réalisée par "tournage" du liquide préoxydé jusqu'à la température de 100°C.

3°. La distillation fractionnée sous 2 mmHg conduit à deux fractions ; une première fraction jusqu'à 63°C., une deuxième entre 63 et 105°C ; il reste un résidu indistillable.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau IV. (voir tableau IV,page suivante).

	Quantité de départ	*Préoxydation t° atteinte*	*OXYDATION*		*Vol. de pinène oxydé*	*Rdt. en dérivés oxydés*
			tps néces p/atteindre 55°C	*temps néces. p/ passer de 55°à100°*		
α-Pinène	1 l	20°	10 mn	6'30"	750 ml	8,6 %
β-Pinène	1 l	20°	10 mn	7'30"	750 ml	5,4 %

Tableau IV - Oxydation des α et β-pinènes.

Δ_3 - *carène :*

Pour le Δ_3-carène, l'oxydation a porté sur une trop petite quantité de départ (200 cm^3) pour obtenir un "tournage" efficace ; elle a été effectuée à 85°C après un préchauffage à 55°C. Malgré ces conditions moins favorables, le rendement est cependant de 10 %, ce qui semble indiquer que le Δ_3-carène est très sensible à cette méthode d'oxydation.

Camphène :

Nous avons été obligatoirement limitée à la préoxydation ; lors du bullage, en effet, le camphène se prend en une masse cristallisée ; c'est elle que nous avons analysée lors des essais décrits dans la deuxième partie.

En définitive les conditions d'oxydation et de distillation des α et β-pinènes et du Δ_3-carène sont identiques à celles observées pour l'essence de Pin mais différentes de celles observées pour les essences de Niaouli et d'Eucalyptus.

---°---

Chapitre IV

NATURE ET MODE DE FORMATION DES DERIVES D'OXYDATION

On sait que la plupart des huiles essentielles s'altèrent facilement à l'air par suite d'une autoxydation (*) influencée par la lumière, la chaleur et la présence d'éléments métalliques ; il en résulte une variation des caractères analytiques, tant physiques (caractères organoleptiques, viscosité, densité, pouvoir rotatoire, indice de réfraction), que chimiques (apparition de peroxydes et de leurs produits de décomposition).

L'oxydation catalytique des essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus, réalisée dans les conditions que nous avons décrites, n'est en réalité qu'une autoxydation catalysée par l'essence de térébenthine vieillie et l'abiétate de cobalt-III et conduisant à la formation, par l'intermédiaire de peroxydes transitoires, de différents dérivés, alcools, aldéhydes, cétones et acides.

(*) *On entend par autoxydation (contraction des deux mots anglais "autocatalytic oxidation" l'oxydation par l'oxygène de l'air autocatalysée.*

A. MECANISME DE L'AUTO-OXYDATION.

L'essence de térébenthine vieillie apporte dans le milieu réactionnel de l'hydroperoxyde de pinène et le peroxyde correspondant que nous représenterons respectivement par ROOH et ROOR, et dont la décomposition est favorisée par la chaleur et le catalyseur métallique. Le déclenchement de la péroxydation des essences peut alors s'expliquer :

$$ROOH \rightarrow RO^{\circ} + HO^{\circ} \quad (M1)$$
$$ROOH \rightarrow ROO^{\circ} + H^{\circ}$$
$$ROOR \rightarrow RO^{\circ} + RO^{\circ} \quad (M2)$$

Les radicaux HO°, RO° et ROO° réagissent alors sur une molécule de carbure terpénique, pour donner naissance à des radicaux hydrocarbonés R°.

$$RO^{\circ} + RH \rightarrow R^{\circ} + ROH \quad (M3)$$
$$HO^{\circ} + RH \rightarrow R^{\circ} + H_2O$$
$$ROO^{\circ} + RH \rightarrow R^{\circ} + ROOH$$

Ce sont ces radicaux R° qui rendent possible l'autoxydation, par réaction en chaîne avec formation d'hydroperoxydes ou de peroxydes, selon le mécanisme classique.

. *Hydroperoxydes.*

$$\left.\begin{array}{l} R^{\circ} + O_2 \rightarrow ROO^{\circ} \\ ROO^{\circ} + RH \rightarrow ROOH + R^{\circ} \end{array}\right\} \quad (M4)$$

. *Peroxydes.*

$$R^{\circ} + ROO^{\circ} \rightarrow ROOR \quad (M5)$$

Les hydroperoxydes une fois formés se décomposent sous l'influence de la chaleur suivant différents processus.

1°. La déshydratation conduit aux cétones ou aux aldéhydes générateurs d'acides.

$$R\text{-}CO\text{-}R' + H_2O \quad (M6)$$

$$\longrightarrow \quad R\text{-}CHO + H_2O \qquad (M7)$$

Il peut également se former des aldéhydes par action de radicaux RO° fournis aussi bien par les peroxydes que par les hydroperoxydes, sur des radicaux R° (58).

$$R\ CH_2O^\circ \quad + \quad R'^\circ \longrightarrow \quad R\text{-}CHO \quad + R'H \qquad (M8)$$

2°. Par libération d'un atome d'oxygène, il se forme un alcool.

$$\longrightarrow \quad RCHOHR' \quad + \frac{1}{2} \quad O_2 \qquad (M9)$$

B. DERIVES FORMES AU COURS DE L'AUTOXYDATION DES TERPENES.

L'autoxydation des essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus affecte principalement les α et β-pinènes, le Δ_3-carène, le limonène, le myrcène, le terpinolène et le terpinène.

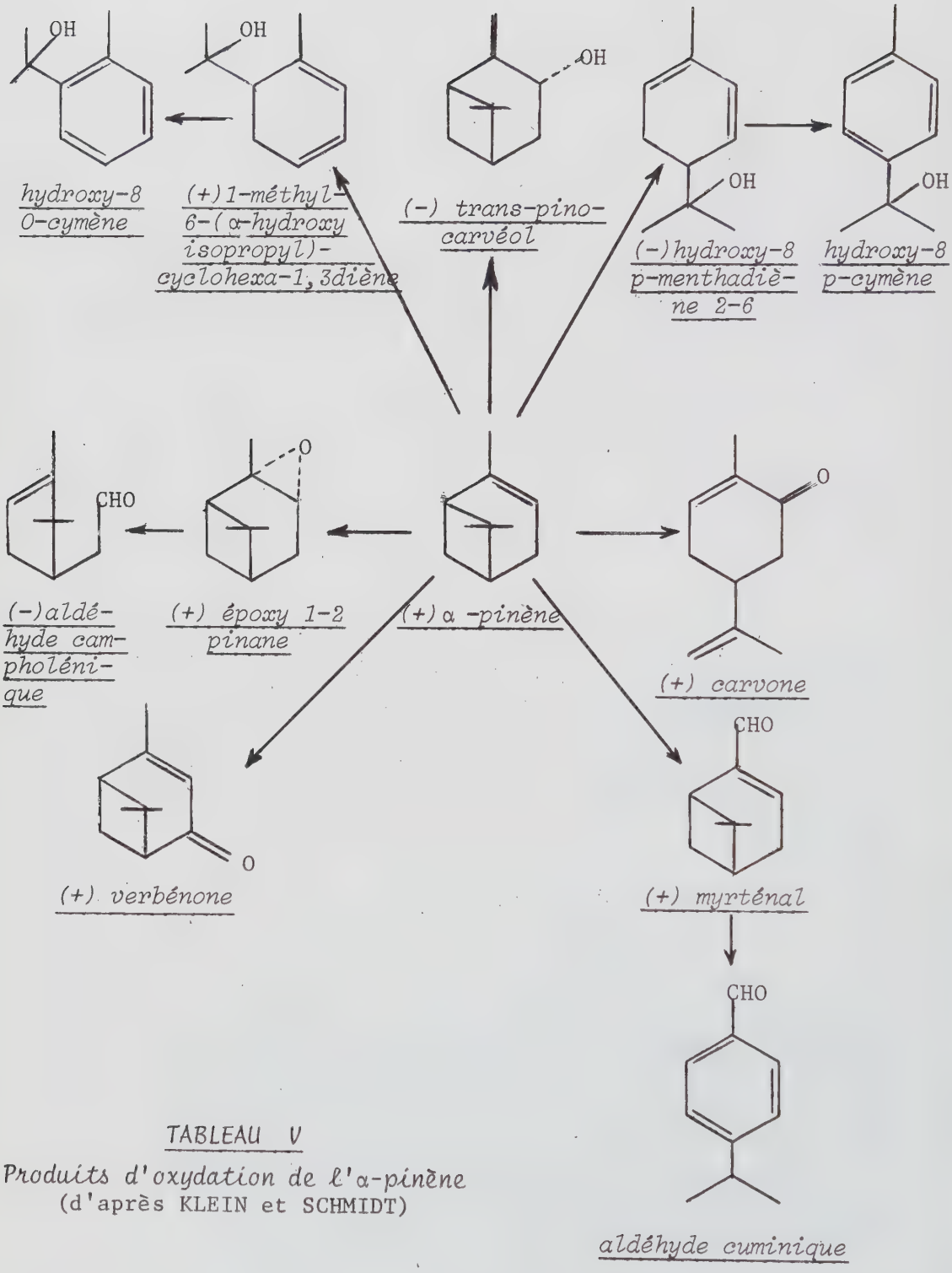
a) Carbures terpéniques :

. α-Pinène

La vitesse d'autoxydation de l'α-pinène par l'air ou par l'oxygène (22) est accrue par la chaleur, l'agitation et les composés pro-oxygène, tel que l'abiétate de cobalt-III (20-21). La réaction a fait l'objet de plusieurs études ; la nature des produits formés varie avec les catalyseurs et les conditions opératoires :

M. SUSINI (73) obtient, en présence de salcomine (1) un mélange d'alcools dont les principaux sont le trans-verbénol, le trans-pinocarveol et le myrténol.

(1) *Salcomine : cobalt-disalicylal-éthylène-diamine*



hydroxy-8 O-cymène

(+) 1-méthyl-6-(α-hydroxy isopropyl)-cyclohexa-1,3diène

(-) trans-pinocarvéol

(-) hydroxy-8 p-menthadiène 2-6

hydroxy-8 p-cymène

(-) aldéhyde campholénique

(+) époxy 1-2 pinane

(+) α -pinène

(+) carvone

(+) verbénone

(+) myrténal

aldéhyde cuminique

TABLEAU V

Produits d'oxydation de l'α-pinène
(d'après KLEIN et SCHMIDT)

BLUMANN et ZEITSCHEL (9) ont identifé, en l'absence de catalyseur, le verbénol et la verbénone que DUPONT et ZACHAREWICZ (24) obtiennent par oxydation en atmosphère d'oxygène et en présence d'abiétate de cobalt-III et que BADOCHE (3) a, de son côté, signalé parmi les produits de l'oxydation de l'α-pinène, catalysée par l'anhydride chromique, à la température et à la pression ordinaire.

Ultérieurement, KLEIN et SCHMIDT (44) montrent que dans les mêmes conditions, il se forme, outre de la verbénone, un certain nombre d'autres composés : tableau V. Ils notent la présence, intéressante, d'aldéhyde campholénique qui pourrait être attribuée à une isomérisation, par l'anhydride chromique, de l'époxy-1,2 pinane, produit normal de l'autoxydation naturelle de l'α-pinène. Ces résultats s'expliquent par la formation, au début de l'oxydation, de peroxydes qui seraient ultérieurement décomposés sous l'influence de sel cobaltique.

De nombreux auteurs ont en effet montré que les peroxydes ROOR, les hydroperoxydes ROOH et les peresters $RCOOR'$, engendrent des radicaux libres RO° et ROO° sous l'action de sels métalliques (de cobalt et de cuivre en particulier) (25, 45, 70,83) et servent ainsi d'amorceurs dans des additions radicalaires sur les carbones en α de la double liaison des α et β-pinènes (25, 27, 45, 83).

La formation de peroxydes, particulièrement étudiés par FILLIATRE (25), semble jouer dans notre cas un rôle mineur par rapport à celle des hydroperoxydes.

Les composés de type ROOR' sont en effet, en général, assez stables et si l'on peut envisager leur rupture homolytique sous l'influence de l'ion cobaltique, on conçoit mal comment, dans nos conditions de travail, les radicaux formés pourraient engendrer des alcools et des cétones, dont la formation s'explique par contre très bien, comme nous l'avons vu, à partir des hydroperoxydes.

Quant aux aldéhydes et aux acides, ils prennent naissance aussi bien à partir des peroxydes (Mec. 2 + 7) que des hydroperoxydes (Mec. 7 ; 1+ 8).

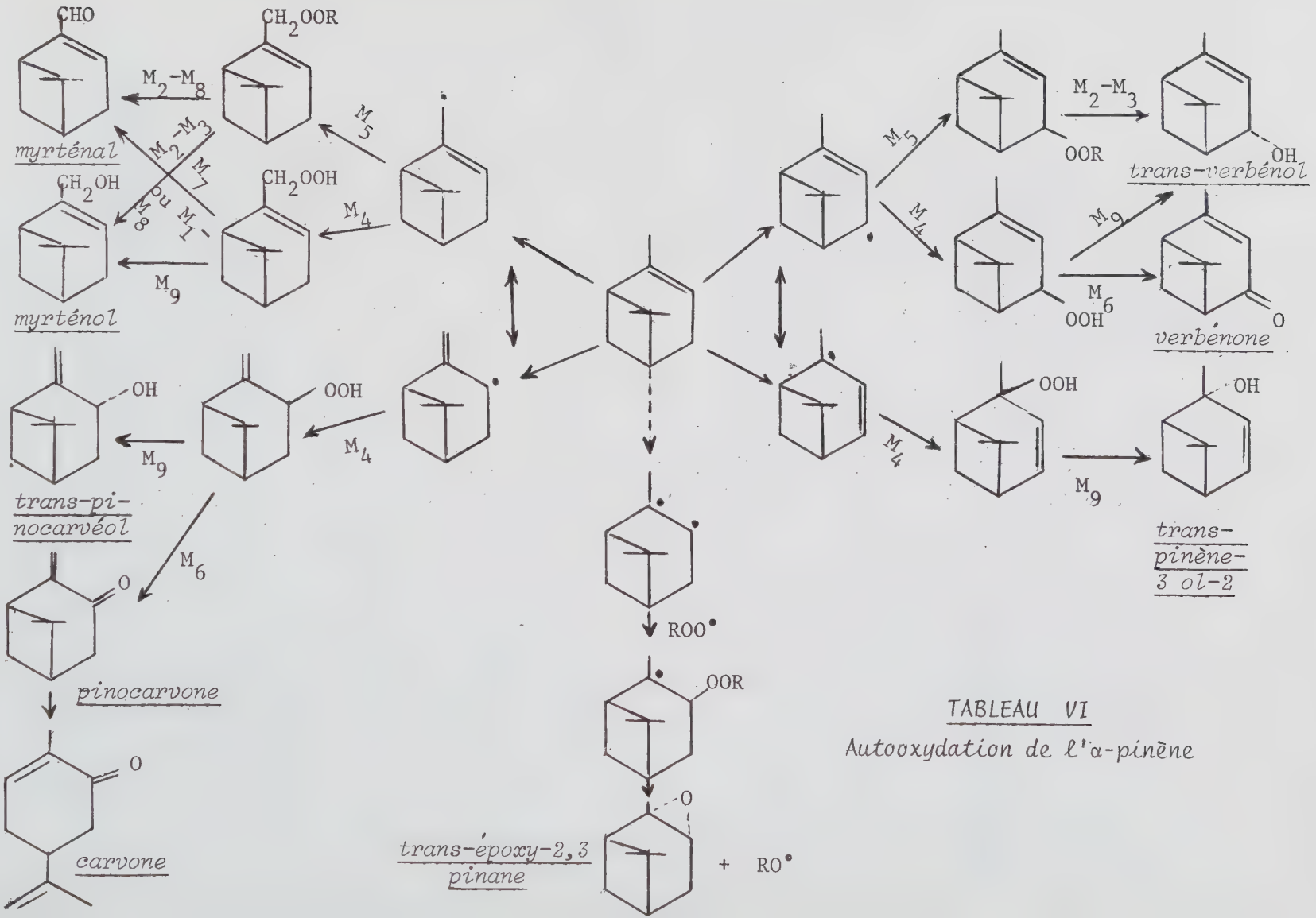


TABLEAU VI

Autooxydation de l'α-pinène

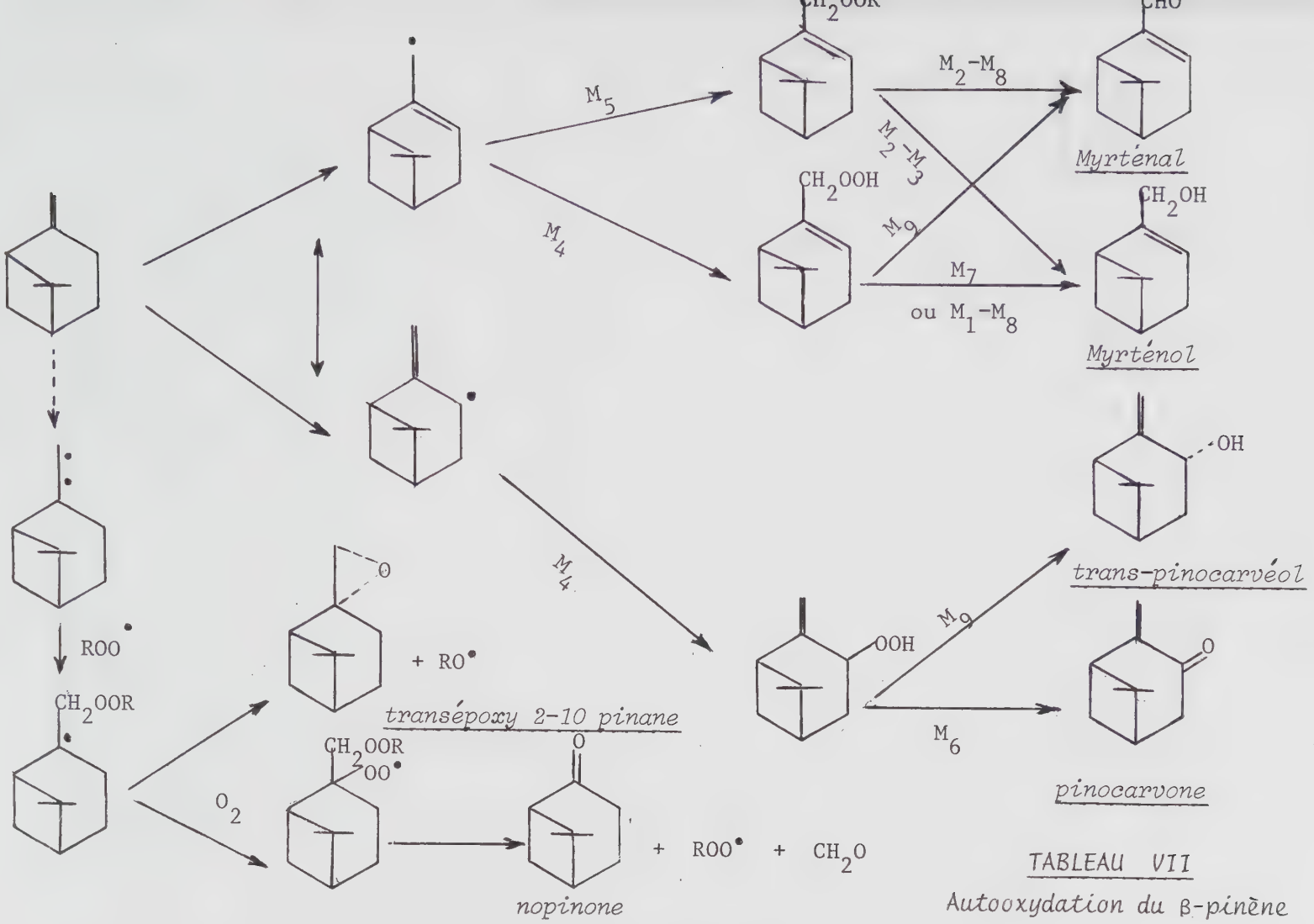


TABLEAU VII

Autooxydation du β-pinène

L'ensemble des réactions d'autoxydation de l'α-pinène est résumé dans le tableau VI.

On voit que ce carbure est susceptible de former quatre types de radicaux, en équilibre deux à deux par suite de réarangements moléculaires (25) et à partir desquels on peut envisager la formation d'hydroperoxydes et de peroxydes, puis celle d'alcools, de cétones, et également d'aldéhydes selon les mécanismes que nous avons déjà décrits.

Nous n'avons fait figurer la peroxydation que dans les 2 cas où l'encombrement stérique de la molécule la rend probable.

Il est alors possible d'obtenir les mêmes dérivés alcooliques par des mécanismes différents (verbénols, myrténols).

La formation de myrténal est aussi expliquée, indépendamment de toute oxydation ultérieure du myrténol.

En plus des additions radicalaires en α de la double liaison, on peut émettre l'hypothèse de l'addition d'un radical peroxyde sur la double liaison elle-même (59-72). On obtient alors un époxyde du pinane dont la formation avait été envisagée par KLEIN et SCHMIDT (44).

Ces différents schémas réactionnels permettent d'interpréter la formation des dérivés signalés par différents auteurs dans les produits d'autoxydation catalytique de l'α-pinène.

.β -*pinène (ou nopinène)*.

Bien que le β-pinène soit moins facilement autoxydable à l'air que l'α-pinène (22), SUSINI (73) a obtenu en présence de catalyseur organocobaltique, un mélange de pinocarvéol, de myrténol, de myrténal et de pinocarvone.

Il semble que l'on puisse invoquer là aussi une addition radicalaire, initiée par les peroxydes présents dans le milieu sur les carbones en α de la double liaison (25, 27, 45, 83), ainsi que sur la double liaison elle-même (59, 72).

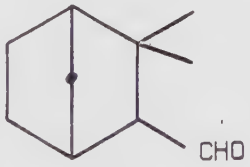
Un schéma réactionnel du même type que celui de l'α-pinène est indiqué dans le tableau VII.

Toutefois le β-pinène donne naissance à deux radicaux mésomères seulement, l'hydrogène tertiaire fixé sur le carbone 1 étant connu en série terpénique bicyclique pour sa faible réactivité (25).

On peut envisager, par addition sur la double liaison non seulement la formation d'époxyde, mais celle de nopinone (59).

. *Autres carbures* : Δ_3-carène, camphène, limonène myrcène, terpinolène, terpinène.

- Le Δ_3-carène s'oxyde très rapidement à l'air avec formation d'alcools et de cétones ; mais l'auto-oxydation catalytique n'a pas fait l'objet de recherches.
- Le camphène s'oxyde à l'air très lentement et conduit au camphre ou à l'aldéhyde camphénilique bien qu'il ne soit pas attaqué par le chromate de t-butyle utilisé comme agent oxydant.



- Le limonène autoxydé en présence de salcomine a conduit SUSINI (73) à un mélange de carvéol, de carvone et de périllaldéhyde.

MATSUURA (51) obtient par oxydation de ce carbure en présence de chromate de ter-butyle un mélange essentiellement constitué de carvone et d'isopiperitone ainsi que d'une petite quantité de piperitone.

FILLIATRE (25) compare l'autoxydation par l'oxygène de l'air et son oxydation par les peroxydes ; l'attaque de la molécule est similaire et s'effectue en α de la double liaison intra cyclique. Dans ces conditions, et par un mécaniqme rigoureusement identique à celui que nous avons vu pour les α et β-pinènes, on peut expliquer la

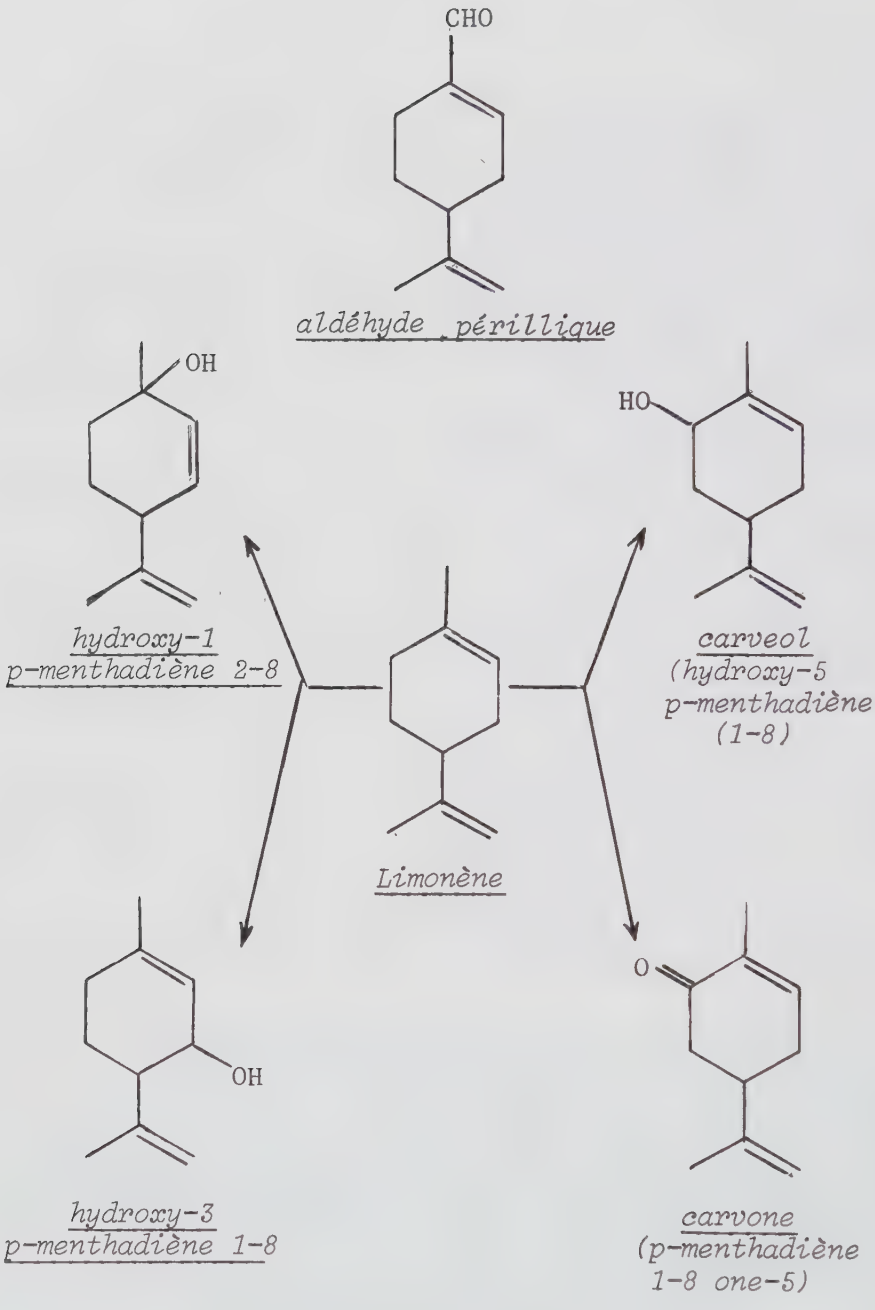


TABLEAU VIII

Autooxydation du limonène

formation de carvéol et de carvone, ainsi que de p-menthadiène 1-8 al - 3 et d'isopiperitone d'une part, de p-menthadiène 2-8 ol- 1 d'autre part.

Ces différentes possibilités sont résumées dans le tableau VIII.

- Le myrcène par autoxydation en présence d'un catalyseur cobaltique (73) donne du myrcénol, du myrcénal et une cétone.

- Le terpinolène et l'α-terpinène oxydés par le chromate de terbutyle (51) est générateur des produits suivants : pipéritone, hydroxy-8 p-cymène, p-cymène, p-isopropényltoluène pour le premier ; carvacrol, thymol, p-cymène, p-isopropénylтoluène, p-méthylacétophénone, p-menthadiène 1-3 al-7 hydroxy 1- p-menthéne-3 one-2, hydroxy-4 p-menthène-1 one 3 et cuminaldéhyde, pour le second.

Ces différents composés sont groupés dans le tableau IX.

b. Dérivés autres que les carbures.

L'eucalyptol n'est pas touché par l'autoxydation. Les alcools peuvent donner des cétones ou des aldéhydes, ces derniers étant oxydables en acides; on peut ainsi envisager la formation de la pinocarvone à partir du pinocarvéol, de la verbénone à partir du verbénol, du myrténal à partir du myrténol et de l'acide pinique à partir du myrténal.

En résumé on peut prévoir par autoxydation des carbures précité la formation des composés suivants :

- *Dérivés de la série du pinane :* myrténol, trans-pinocarvéol, trans-verbénol, myrténal, pinocarvone, verbenone, nopinone et acide pinique :

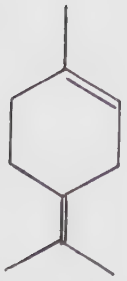
- *Dérivés de la série du p-menthane :* hydroxy-4 p-menthène-1 one-3, piperitone et hydroxy-1 p-menthène-3 one-2 d'une part, hydroxy-8 p-menthadiène 2-6, p-menthadiène-1,3 al-7, hydroxy-1 p-menthadiène-2,8, hydroxy-3 p-menthadiène-1,8, carvéol, carvone, aldéhyde périllique d'autre part.

- *Dérivés de la série du camphane :* aldéhyde camphénilique en particulier ; et enfin

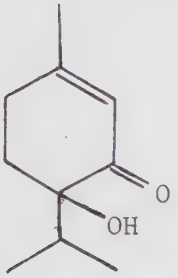
- *Dérivés aromatiques* : formés à partir des précédents : p-cymène, hydroxy- 8 p-cymène, p-méthylacétophénone, p-isopropényltoluène, thymol, carvacrol et aldéhyde cuminique.

---°---

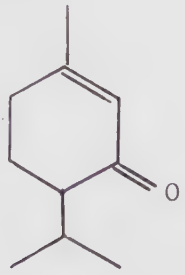
α-terpinène



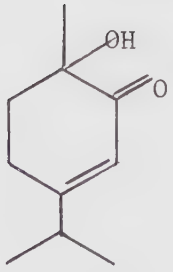
terpinolène



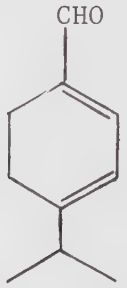
hydroxy-4
p-menthène-1 one-3



pipéritone



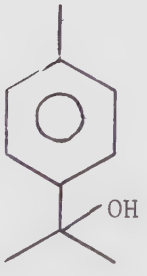
hydroxy-1
p-menthène-3 one-2



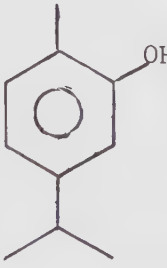
p-menthadiène
1-3 al-7

méthyl
tophé-
one

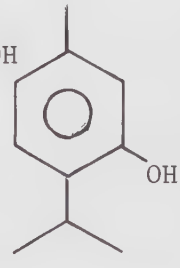
p-cymène



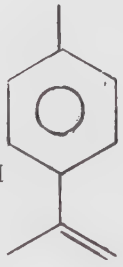
hydroxy-8
p-cymène



carvacrol



thymol



p-isopropényl
toluène

aldé-
hyde
cumi-
nique

TABLEAU IX

Oxydation du terpinène et du terpinolène
par le chromate de t-butyle

DEUXIEME PARTIE

ANALYSE DES ESSENCES ET DES DERIVES OXYDES

---°---

La détermination des indices chimiques et l'application de la chromatographie sur souche mince et de la chromatographie gaz-liquide nous ont permis de mettre en évidence les principaux constituants des essences oxydées. Nous avons effectué des analyses similaires sur des essences autoxydées. L'interprétation de nos résultats a été facilitée par l'étude analytique des dérivés d'oxydation des carbures dont la préparation a été décrite dans la première partie.

---°---

Chapitre I

METHODES GENERALES D'ANALYSE

En dehors de leurs caractères physiques, les essences qui ont été déjà décrites (chapitre II) peuvent être analysées suivant deux groupes de méthodes :

. Méthodes chimiques,
. Méthodes physiques,

que nous aborderons successivement.

I. METHODES CHIMIQUES.

Outre quelques techniques décrites dans certains cas particuliers, par exemple le dosage du citral dans l'essence de citron par formation d'une base de Schiff avec la benzidine, d'un complexe avec le vanillal , ou sa condensation avec l'acide barbiturique (18), les méthodes chimiques sont essentiellement fondées sur l'étude des indices fonctionnels : indice d'ester, indice d'hydroxylamine, indice d'acide qui nous renseignent sur la teneur des essences, respectivement en alcools, aldéhydes, cétones et acides.

Dans le cas des trois essences étudiées la connaissance de ces indices nous permettra de comparer la teneur en dérivés hydroxylés, carbonylée et carboxylés.

Avant d'exposer nos résultats nous rappellerons rapidement les principaux essais relatifs aux différents types de dérivés.

1°. ESSAIS RELATIFS AUX DERIVES HYDROXYLES :

L'estérification de la fonction hydroxyle est à la base de nombreuses méthodes de dosage :

A. *Acétylation* : elle résulte le plus souvent de l'action de l'anhydride acétique dans différentes conditions.

a) En présence de pyridine : C'est l'acétylation pyridinée, selon la méthode de VERLEY et BOELSING (80, 81) reprise par DELABY et SABETAY (19), et qui a été discutée par différents auteurs, notamment par LEMAN (47) MESNARD et BERTUCAT (8, 52).

b) En présence d'acide phosphorique : c'est l'acétylation phosphorique qui a également été très étudiée par MESNARD et BERTUCAT (53, 54).

c) C'est auteurs ont préféré par la suite *l'acide p-toluène-sulfonique :* c'est l'acétylation p-toluène-sulfonique qui conduit aux mêmes résultats et présente l'avantage d'être plus rapide (55).

d) L'acétylation peut être également réalisée par le chlorure d'acétyle (26) mais le réactif est peu maniable.

B. *Formylation* : elle a été proposée par GLICHITCH (31), et met en oeuvre un mélange d'acide formique et d'anhydride acétique ; il s'agit donc d'une formylation par l'anhydride acétoformique (découvert par BEHAL en 1930).

C. *Tosylation* : Introduite par GIBIRILA, MESNARD et BERTUCAT (30,58) elle utilise le chlorure de p-toluène sulfonyle ou chlorure de tosyle en présence de pyridine.

On peut combiner plusieurs de ces méthodes pour effectuer le dosage sélectif d'alcools terpéniques en mélange.

Ainsi HOLNESS (39) dose le citronellol , le géraniol et le linalol en présence les uns des autres. Par acétylation pyridinée, il estérifie le citronellol et le géraniol ; en présence d'anhydride acétique et d'acétate de sodium, il obtient les alcools totaux ((BOULEZ 11) acétylation des 3 classes d'alcool par l'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium et de xylène à chaud).Enfin par action d'acide p-toluène-sulfonique en présence de xylène il déshydrate le géraniol ce qui lui permet d'acétyler le citronellol seul.

Les résultats obtenus par les méthodes que nous avons citées diffèrent selon la technique utilisée.

- l'acétylation pyridinée permet l'estérification totale des alcools primaire et secondaires, ainsi que des phénols mais celle des alcools tertiaires ne dépasse jamais 15 %.

- l'acétylation phosphorique permet au contraire l'estérification de tous les alcools, quelle que soit leur classe (40, 53, 67).

En milieu phosphorique, l'anhydride acétique réagit également sur différentes fonctions non hydroxylées, éther-oxyde, cétone (60) et surtout aldéhyde et éthylénique (8, 52, 53), inactives en présence de pyridine.

- le chlorure de tosyle estérifie, en présence de pyridine, uniquement les alcools primaires et secondaires à l'exclusion des alcools tertiaires dont la réactivité rappelons-le, est faible mais non nulle en acétylation pyridinée.

Les résultats fournis par l'acétylation pyridinée l'acétylation p-toluène-sulfonique et la tosylation donneront donc une idée de la proportion d'alcools primaires et secondaires d'une part, d'alcools tertaires d'autre part, existant dans les essences.

La comparaison des indices d'acétylation p-toluène-sulfonique et phosphorique mettra en évidence la présence d'éther-oxyde (eucalyptol), de carbures éthyléniques et

également d'alcools tertiaires, dont la proportion sera donnée plus précisément par la comparaison entre l'indice d'acétylation p-toluène-sulfonique et l'indice de tosylation pyridinée (tableau X).

2°. ESSAIS RELATIFS AUX DERIVES CARBONYLES.

Les méthodes analytiques relatives aux dérivés carbonylés dans les essences sont essentiellement fondées sur :

a) la formation d'une hydrazone à partir d'une hydrazine :

$$\diagdown\!\!\diagup C = O + H_2N\text{-}NHR \rightarrow \diagdown\!\!\diagup C = N\text{-}NHR + H_2O.$$

b) la formation d'une oxime à partir de l'hydroxylamine.

$$\diagdown\!\!\diagup C = O + H_2N\text{-}OH \rightarrow \diagdown\!\!\diagup C = N\text{-}OH + H_2O.$$

Nous retiendrons :

a) Le test de BRADY (12).

Il s'agit d'un test qualitatif. Un mélange de dinitro 2-4 phénylhydrazine et de dérivés carbonylés prend une teinte orangée puis rougeâtre suivie de l'apparition d'un précipité rouge-orangé.

b) L'indice d'hydroxylamine de SMITH et BRYANT (15)

Cet indice est quantitatif. L'oxime est formée par action du chlorhydrate d'hydroxylamine sur un dérivé carbonylé ; la réaction s'accompagne de la libération d'une quantité d'acide chlorhydrique équivalente à l'hydroxylamine combinée :

$$\diagdown\!\!\diagup C = O + \left[(H_2 - \underset{\underset{H}{|}}{N} - OH)\right]^{+} Cl^{-} \rightarrow \diagdown\!\!\diagup C = N\text{-}OH + HCl + H_2O$$

La formation d'oxime est accélérée par addition de pyridine ; le chlorure de pyridinium formé est titrable par la soude en présence de phénolphtaléine.

	ACETYLATION PYRIDINEE	*ACETYLATION p-toluène-sulfonique*	*ACETYLATION Phosphorique*	*TOSYLATION Pyridinée*
ALCOOLS				
Primaires	+	+	+	+
Secondaires	+	+	+	+
Tertiaires	⩽ 15 %	+	+	0
AUTRES COMPOSES (Ethyléniques éther-oxydes, aldéhydes, cétones).			+ (partielle)	

Tableau X

Réactifs estérifiants et classes d'alcools

Différentes modifications ont été apportées à cette méthode ; il est possible en particulier d'opérer en milieu anhydre, en présence d'un excès de diéthylamine qui fixe l'acide chlorhydrique libéré et qui est dosé par l'acide perchlorique (42).

On peut aussi doser l'acide chlorhydrique formé par des méthodes électrochimiques (71).

3°. ESSAIS RELATIFS AUX DERIVES CARBOXYLES.

Les dérivés carboxylés sont évalués par la mesure de l'indice d'acide de l'essence (Pharmacopée Française 1965 - 8ème Edition, p.1557).

II. METHODES PHYSIQUES.

A l'exception de quelques cas particuliers où l'on cherche à doser un composant déterminé d'une essence, par exemple le dosage spectrophotométrique de l'eucalyptol (49), les méthodes physiques d'analyse des huiles essentielles peuvent être divisées en deux catégories.

1°. METHODES DERIVEES DES TECHNIQUES DE SEPARATION.

Ces méthodes sont basées sur des différences de volatilité ou de solubilité des composants de l'essence ; ce sont la distillation fractionnée et la chromatographie sous ses différentes formes.

Elles peuvent éventuellement être associées (43).

La distillation tend, à l'heure actuelle, à être abandonnée au profit des techniques chromatographiques qui permettent d'une part, non seulement la séparation des différents constituants d'une essence, mais aussi, bien souvent, leur identification et parfois leur dosage, et qui présentent d'autre part un pouvoir de séparation infiniment plus important que celui de la distillation.

Il suffit pour s'en convaincre de consulter les chiffres du tableau XI (64).

Techniques	*Plateaux théoriques*
Distillation (à l'échelle du laboratoire).....	jusqu'à 40
Chromatographie en phase gazeuse	
Colonne remplie	500 - 1500
Colonne capillaire.....	Quelques milliers (50.000-250.000)

Tableau XI

2°. METHODES D'ANALYSE STRUCTURALE.

L'amélioration des techniques de séparation a stimulé l'évolution des techniques d'identification ; elles mettent à notre disposition des quantités de substances de plus en plus faibles, ce qui nécessite, par suite, des méthodes analytiques de plus en plus fines.

Pour cette raison, on a fait appel ces dernières années aux techniques classiques de l'analyse structurale, spectrographies UV, IR, RMN, spectrométrie de masse, couplées en général avec la chromatographie en phase vapeur.

Toutes les méthodes physiques que nous avons citées ont donné lieu à de nombreux travaux dont voici un bref aperçu.

A. Méthodes chromatographiques.

a) Chromatographie sur papier :

Etant donné la faible hydrosolubilité des dérivés terpéniques contenus dans les huiles essentielles, les papiers sont en général hydrofugés ; PARIS et GODON (32, 61, 62) ont utilisé avec succès l'hypalon, l'α-bromobaphtalène ou des paraffines chlorées. Ils ont étudié un grand nombre d'essences, par chromatographie en phase inversée, après mercurisation.

Les composés formés par addition d'un sel mercurique sur la fonction éthylénique de nombreux terpènes ont permis la révèlation d'hydrocarbures non décelés par d'autres méthodes et de composés en très faible quantité.

L'interprétation des chromatogrammes est cependant délicate.

b) Chromatographie en couche mince.

La chromatographie en couche mince est d'une application très générale pour l'analyse des huiles essentielles. Elle est principalement effectuée sur gel de silice, avec des phases mobiles dont la polarité varie en fonction des composés que l'on veut séparer, carbures ou composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones, éther-oxydes) (2,29,32, 50, 56, 61, 62).

Les révélateurs en dehors de ceux qui réagissent avec une fonction particulière (dinitro-2-4 phényl hydrazine pour les cétones, perchlorure de fer pour les phénols, etc...) sont le plus souvent à base d'aldéhydes en milieu sulfurique (vanillal, furfural...) ou de trichlorure d'antimoine, qui sont tous des réactifs de la majorité des huiles essentielles.

Certains auteurs séparent les alcools terpéniques primaires et secondaires des alcools tertiaires dans des essences de térébenthine sous forme de dinitro 3,5 benzoates (69).

Enfin l'utilisation de couches de gel de silice imprégnées de nitrate d'argent (48, 74) semble donner de bons résultats dans l'analyse d'alcools isomères et permettre, en fonction du degré d'insaturation du terpène et grâce à la formation de complexes avec l'ion Ag^+ des séparations impossibles en chromatographie gazeuse (46).

c) Chromatographie gaz-liquide:

Depuis sa découverte , la chromatographie gazeuse est devenue rapidement inséparable de l'étude des essences.

Les difficultés de cette technique sont liées à l'instabilité des terpènes sous l'influence d'une température de colonne trop élevé, ou d'éventuelles propriétés

catalytiques dues au support, (7) ou encore à la complexité de certains produits naturels.

De ce fait un très grand nombre de supports solides et de phases stationnaires ont été mis en oeuvre : charbon (63), sable, pierre ponce (4), petites billes de verre, brique (37), etc...pour les supports ; solvants plus ou moins polaires, huiles, graisses, polyéthylèneglycols et leurs esters, silicones (5), etc.. pour les phases stationnaires.

Dans la pratique le chromosorb W (1) (ou celite 545) et la brique C-22 (2) d'une part, les carbowax, les esters de polyéthylèneglycols ou de polypropylèneglycols, et les huiles de silicone d'autre part, sont les supports et les phases fixes les plus employés.

Un grand nombre de recherches ont été effectuées dans la série terpénique par chromatographie gazeuse :

TER HEIDE (74) étudie les acétates d'alcools monoterpéniques sur Apiezon (3) et sur carbowax 20 M.ZUBYK et CONNER (84) chromatographient des carbures terpéniques mono et bicycliques ainsi que les carbures aromatiques qui les accompagnent souvent, des alcools, des cétones, des éthers, sur célite 545 imprégnée de phtalate de didecyle à des températures de 110° C à 130° C.

Ils appliquent avec succès cette méthode à l'étude de l'hydratation de l'α-pinène.

(1) Le chromosorb W et la célite 545 sont préparés par calcination des terres à diatomées avec du carbonate de sodium à 900° pour le premier et 780° pour la seconde.

(2) La brique C 22 est préparée en mélangeant des diatomées calcinées avec de l'argile.

(3) Apiézon : hydrocarbures de P.M. élevé .

THIES et SCHUSTER (75) séparent un très grand nombre de terpènes sur chromosorb G (1) imprégné de succinate de diéthylèneglycol ou sur brique C 22 imprégnée de silicone à température programmée de 55° à 185° C pour le premier et isotherme de 160° C pour le second.

Certains composés ne peuvent être séparés, mais la comparaison des deux enregistrements permet souvent de les identifier.

Ces méthodes ont été appliquées, non seulement à des terpènes isolés, mais aussi à des produits végétaux et plus particulièrement aux essences. BRUS (14) sépare les carbures terpéniques composant l'essence de térébenthine sur silocel(2) imprégné de sébaçate de polypropylèneglycol à 110° C et les identifie dans des essences de provenances diverses.

VON RUDOLF (66) analyse l'huile essentielle extraite du *juniperus communis ;* il effectue d'abord une chromatographie sur colonne d'acide silicique, éluée successivement par trois solvants de polarité croissante (pétrole, chlorure de méthylène et méthanol), puis chromatographie séparément ces éluats, sur Carbowax 20 M. Il sépare ainsi dans la première fraction, les carbures terpéniques, dans la seconde, des esters, des aldéhydes,et des cétones, et dans la troisième, des alcools.

D'après SCHANTZ (68) la chromatographie gaz-liquide serait d'ailleurs particulièrement intéressante comme critère chimiotaxonomique. Elle permet en effet de classer les végétaux d'après la composition de leur essence ; l'auteur différencie ainsi plusieurs espèces et en particulier des conifères, selon leur origine géographique.

Le problème de l'extraction de l'huile essentielle se pose alors, car elle risque d'en modifier la composition.

(1) Le chromosorb G est préparé par calcination des terres de diatomées sous courant gazeux.

(2) Silocel : terre à brique.

HEROUT (38) compare différentes méthodes d'extraction et propose d'absorber l'essence sur Apiézon ; ROBERTS (65) introduit directement le tissu de la plante dans l'injecteur.

Enfin certains travaux ont été effectués en vue de relier le volume de rétention d'un terpène à une structure particulière (63, 74).

3. *Les méthodes d'analyse structurale.*

L'identification précise de la structure des composés terpéniques isolés nécessite les méthodes physiques les plus modernes. Si la spectrophotométrie ultra-violette n'offre que des possibilités restreintes, par contre la spectrométrie infra-rouge permet de déceler avec précision la présence et la nature de certains groupements fonctionnels, hydroxyle, carbonyle, carboxyle, etc...

KALSI (41) étudie ainsi des esters acétiques et carboxyliques terpéniques, et note des bandes caractéristiques d'absorption dans la région de 1100^{-1}cm et 1300^{-1}cm.

Ces méthodes sont en général couplées avec la chromatographie en phase gazeuse, soit que l'on veuille purifier les composés analysés, soit que l'on désire les séparer dans un mélange, une huile essentielle par exemple.

La qualité des spectres obtenus dépend d'ailleurs des conditions de la séparation chromatographique (10).

BARDYSHEV (6) identifie des carbures terpéniques (bornylène, camphène) après purification par chromatographie gazeuse à 130°C sur brique imprégnée de 30 % de phtalate de nonyle.

VALENTE (79) d'une part et GARCIA (28) d'autre part, identifient isolément, puis dans l'essence d'eucalyptus, l'eucalyptol, le limonène, p-cymène et l'α-pinène.

Outre la spectrométrie infra-rouge, la spectrométrie de masse est une technique de choix pour l'étude de la structure des terpènes. Sa sensibilité exige une grande pureté de l'échantillon analysé ; le couplage avec les techniques chromatographiques (réalisé en général sur le même

appareillage) a permis de résoudre ici les problèmes posés par l'existence de nombreux isomères se différenciant très nettement par leurs spectres de masse : carbures monoterpéniques de la série du menthane et du carane (33), carbures diterpéniques (1) aldéhydes et cétones monoterpéniques (16), caranols (17).

D'après VERNIN (82) l'interprétation des spectres reste délicate du fait de la similitude de la majorité des fragments produits et du manque d'informations sur les processus de fragmentation.

La résonnance magnétique nucléaire permettra enfin de connaître le nombre et la position des protons de la structure envisagée.

---°---

Chapitre II

ANALYSE COMPAREE DES ESSENCES ET DES DERIVES OXYDES PAR LES METHODES CHIMIQUES

I. ESSAIS RELATIFS AUX DERIVES HYDROXYLES (57).

Expérimentalement nous avons mesuré trois indices : l'indice d'acétylation pyridinée, l'indice d'acétylation p-toluène-sulfonique et l'indice de tosylation pyridinée. Ils représentent le nombre de mg d'acide acétique ou d'acide p-toluène-sulfonique réagissant avec 1 g de substance.

A. PROTOCOLES OPERATOIRES .

1°. Indice d'acétylation pyridinée (8, 52, 53).

Réactif : mélange de trois parties de pyridine et d'une partie d'anhydride acétique.

Technique : on met en contact 0,5 g d'essence et 5 ml de réactif pendant 24 h à la température ordinaire, après quoi l'excès d'anhydride est hydrolysé par addition de 50 ml d'eau distillée. On titre l'acidité libérée par une solution d'hydroxyde de sodium 0,5 N, Un essai témoin est effectué dans les mêmes conditions, sans l'échantillon à analyser.

Résultat : soient =

N ml de solution alcaline utilisés pour l'essai témoin
N' ml de solution alcaline utilisés pour l'essai avec la substance à analyser.

I.A. l'indice d'acidité de l'essence, mesuré par ailleurs.

L'indice d'acétylation pyridinée est donné par la relation :

$$\frac{0,5\ (N - N')\ 60,1}{0,50} + \frac{60,1\ I.A.}{56,11} = 60,1\ (N - N') + 1,07\ I.A.$$

(60,1 et 56,11 sont les poids moléculaires respectifs de l'acide acétique et de l'hydroxyde de potassium).

2°. Indice d'acétylation p-toluène-sulfonique (55)

Réactif :

acide p-toluène-sulfonique : 1 g
anhydride acétique..... : 15 ml
dioxanne..... : 30 ml

Le mélange est effectué dans l'ordre indiqué. Le réactif est utilisable 30 mn après sa préparation, temps nécessaire pour une complète dissolution de l'acide.

Technique : on met en contact 0,5 g d'essence avec 5 ml de réactif, pendant 24 h à la température ordinaire. Après ce temps on hydrolyse l'excès d'anhydride avec 50 ml d'une solution aqueuse de pyridine à 5 %. L'acidité est ensuite titrée avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,5 N.

Un essai à blanc est effectué dans les mêmes conditions.

Résultats : l'indice d'acétylation p-toluène-sulfonique est calculé comme le précédent.

3°. Indice de tosylation pyridinée (30,58).

Réactif :

Chlorure de tosyle : 20 g
pyridine ..... : 100 ml

Ce réactif doit être employé 12 h au moins et 48 h au plus après sa préparation.

Technique : on met en contact 0,5 g d'essence avec 5 ml de réactif tosylant, à la température ordinaire, pendant

2 h. Après ce temps, on hydrolyse l'excès de chlorure de tosyle par addition de 10 ml de pyridine et de 30 ml d'eau distillée.

L'acide libéré est titré par la solution d'hydroxyde de sodium 0,5 N.

Un essai témoin est pratiqué dans les mêmes conditions.

Résultats : soient :

N ml de solution alcaline utilisés pour l'essai témoin.
N' ml de solution alcaline utilisés pour l'essai avec l'essence

I.A. l'indice d'acide de l'essence.

L'indice de tosylation pyridinée est donné par la relation :

$$\frac{0,50\ (N - N')\ 172}{0,50} + \frac{172\ I.A.}{56,11} = 172\ (N - N') + 3,06\ I.A.$$

(172 et 56,11 sont respectivement les poids moléculaires de l'acide p-toluène-sulfonique et de l'hydroxyde de potassium).

B. RESULTATS.

Les indices exprimés comme nous venons de le voir ne sont pas comparables directement, puisque chacun se réfère à un réactif différent.

Aussi est-il préférable de les exprimer par rapport au groupement hydroxyle : on obtient ainsi l'indice d'estérification, c'est-à-dire le nombre de mg d'hydroxyle OH estérifié dans 1 g de substance ; l'indice est alors indépendant de la nature de l'agent estérifiant.

Les indices d'estérification sont obtenus à partir des relations suivantes.

Indice d'estérification

$= \frac{17}{60,1}$ x indice d'acétylation

= 0,283 x indice d'acétylation

$= \frac{17}{172}$ x indice de tosylation

= 0,099 x indice de tosylation

Nous appelerons :

I.E.A.P. = l'indice d'estérification calculé à partir de l'indice d'acétylation pyridinée.

I.E.A.P.T.= celui qui est calculé à partir de l'indice d'acétylation p-toluène-sulfonique.

I.E.T.P. = l'indice d'estérification calculé à partir de l'indice de tosylation pyridinée.

Les différents indices obtenus avec les essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus, avant et après oxydation sont exprimés dans les tableaux XII et XIII.

ESSENCE de	*Indice d'acétylation pyridinée*	*Indice d'acétylation p-toluène-sulfonique*	*Indice de tosylation*
Pin	6,99	13,99	0,841
Pin oxydée	67,62	209,62	206,56
Niaouli	10,32	17,32	9,48
Niaouli oxydée	77,72	141,72	204,38
Eucalyptus	14,87	11,87	2,51
Eucalyptus oxydée	72,86	112,86	193,36

Tableau XII - Indices d'acétylation pyridinée, p-toluène-sulfonique et indice de tosylation pyridinée.

ESSENCE DE	*I.E.A.P.*	*I.E.A.P.T.*	*I.E.T.P.*	*(I.E.A.P.T.) - (I.E.T.P.)*
Pin	1,97	3,95	0,28	3,67
Pin oxydée	19,13	59,32	20,45	38,87
Niaouli	2,92	4,90	0,94	3,96
Niaouli oxydée	21,99	40,11	20,33	19,78
Eucalyptus	4,2	4,2	0,25	3,95
Eucalyptus oxydée	20,62	31,94	19,14	12,80

Tableau XIII - Indices d'estérification.

Si nous les comparons entre eux, nous constatons que :

1°. Les I.E.A.P. et les I.E.T.P. sont du même ordre et rendent compte, pour les essences comme pour les essences oxydées, des alcools primaires et secondaires ; les I.E.A.P. sont toujours légèrement supérieurs aux I.E. T.P. puisqu'ils font intervenir une faible proportion d'alcools tertiaires.

On a de plus :

I.E.T.P. essence d'Eucalyptus $\neq$ I.E.T.P. essence de Pin < I.E.T.P. essence de Niaouli

I.E.T.P. essence d'Eucalyptus $\leq$ I.E.T.P. essence de Niaouli oxydée < I.E.T.P. essence de Pin oxydée.

On peut ainsi comparer les quantités d'alcools primaires et secondaires dans les trois essences, avant et après oxydation. L'augmentation, du même ordre dans les trois cas, pourrait être rapportée à la formation de myrténol, de transpinocarvéol, de trans-verbénol, d'alcools de la série du p-menthadiène et de phénols.

2°. Les différences entre les I.E.A.P.T. et les I.E.T.P. permettent de vérifier la présence d'alcools

tertiaires (tableau XIII) et d'établir la relation suivante, quant à leurs proportions :

essence de Pin ≤ essence d'Eucalyptus ≤ essence de Niaouli
essence d'Eucalyptus ≠ essence de Niaouli < essence de Pin
oxydée oxydée oxydée

Dans tous les cas, la proportion d'alcools tertiaires croît notablement elle aussi avec l'oxydation, surtout pour l'essence de Pin ; il s'agit vraisemblablement d'alcools de la série du menthène, du p-menthadiène, de l'α-pinène, et du p-cymène.

II. ESSAIS RELATIFS AUX DERIVES CARBONYLES.

A. PROTOCOLES OPERATOIRES.

1°. test de BRADY (12).

Réactif : dinitro 2-4 phénylhydrazine : 0,10 g
H_2SO_4 concentré ..... : 1 ml
Ethanol à 95° ..... : 5 ml

La solution est colorée en jaune citron.

Technique : on introduit dans un tube à essais 5 ml de réactif, puis on fait couler en surface V gouttes d'une solution au 1/20e des essences ou de leurs dérivés d'oxydation dans l'éthanol à 95°C.

Résultats : en présence de dérivés carbonylés, il se développe un anneau orangé qui vire au rougeâtre ; si le tube est abandonné au repos, la coloration envahit progressivement tout le liquide ; il apparaît à la longue un précipité rouge orangé.

2°. Indice d'hydroxylamine de SMITH et BRYANT (15).

Réactifs :

a) Réactif à l'hydroxylamine :

On dissout 35 g de chlorhydrate d'hydroxylamine dans 160 ml d'eau distillée et on complète à 1 l avec de l'éthanol à 95 c.

On doit s'assurer au préalable qu'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine ne contient pas d'acide chlorhydrique en quantité importante : 10 g dissous dans 50 ml

d'eau distillée doivent exiger moins de 0,5 ml de soude 0,5 N pour faire virer au bleu vert le bleu de bromophénol.

b) Solution d'indicateur :

On ajoute 0,25 ml de solution éthanolique à 4 % de bleu de bromophénol à 20 ml de pyridine pure et on complète à 1 l avec de l'éthanol à 95c.

c) Solution sodique :

On utilise une solution de soude 0,5 N dans le méthanol.

Technique : dans une fiole d'Erlenmeyer en verre pyrex bouchant à l'émeri on introduit 30 ml de réactif (a) 100 ml de solution d'indicateur (b) et u n poids p voisin de 5 g de l'essence à analyser.

On porte à l'ébullition sous reflux pendant 9 h.

Après ce temps, on refroidit et on titre l'acide chlorhydrique libéré par la soude (c) potentiométriquement ou jusqu'au virage de l'indicateur (b).

On effectue dans les mêmes conditions un essai à blanc.

Résultat : le résultat est exprimé en indice d'hydroxylamine. Soient :

N ml utilisés pour l'essai avec l'essence.
N' ml utilisés pour l'essai témoin.

L'indice est calculé selon la relation suivante :

$$\frac{0,5\ (N - N')\ 56,11}{P}$$

(56,11 est le poids moléculaire de l'hydroxyde de potassium).

B. RESULTATS.

Les résultats obtenus avec les essences et les essences oxydées sont esprimés dans le tableau XIV.

Dans les trois cas, le test de Brady est négatif et l'indice d'hydroxylamine nul, avant l'oxydation ; après l'oxydation, le test de Brady est positif et l'indice d'hydroxylamine révèle la présence de dérivés carbonylés, en proportion équivalente pour les essences d'Eucalyptus et de Niaouli oxydées et supérieure pour l'essence de Pin oxydée.

essence d'Eucalyptus # essence de Niaouli <
oxydée oxydée

essence de Pin
oxydée

Cette augmentation peut être rapportée à la formation d'aldéhydes et de cétones dérivés du p-menthane, aldéhyde périllique, carvone, et de myrténal, pinocarvone, verbénone, nopinone.

III. ESSAI RELATIF AUX DERIVES CARBOXYLES.

Les indices d'acides sont rassemblés dans le tableau XIV.

On voit que la quantité de dérivés carboxylés formés par oxydation est plus importante pour les essences de Niaouli et d'Eucalyptus que pour l'essence de Pin.

Compte tenu des résultats précédents, les essences peuvent être classées par ordre d'intensité d'oxydation décroissante :

essence de Pin > essence d'Eucalyptus > essence de Niaouli.

---°---

Essence	*Test de Brady*	*Indice d'hydroxylamine*	*Indice d'acide*
Pin	0	0	0,93
Pin oxydée	+	49,7	4,32
Niaouli	0	0	3,10
Niaouli oxydée	+	25,6	20,30
Eucalyptus	0	0	0,82
Eucalyptus oxydée	+	27,2	16,7

Tableau XIV

Test de BRADY, indices d'hydroxylamine et indices d'acide.

Chapitre III

ANALYSE COMPAREE DES ESSENCES ET DES DERIVES D'OXYDATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Nous étudierons successivement :

- le p-cymène
- des carbures terpéniques : myrcène, limonène, terpinolène, Δ_3-carène, α et β-pinènes, camphène.
- des dérivés fonctionnels : eucalyptol, terpinéol, pinocarvéol, myrténol, myrténal, myrtanol, carvone, verbénone, hydroxypinocamphone.
- les essences de Pin, de Niaouli, et d'Eucalyptus, avant et après oxydation.

I. MODALITES TECHNIQUES.

Les chromatoplaques sont préparées à partir de Kieselgel G Merck (acide silicique additionné de plâtre) sur 0,25 mm d'épaisseur. L'activation est effectuée à 120° C pendant 20 mn.

- *Solvants :*

Plusieurs solvants de migration ont été essayés :

. hexane
. éther de pétrole
. benzène
. benzène - méthanol (9 : 1)
. benzène hexane - méthanol (7 : 2 : 1)
. hexane - acétate d'éthyle (95 : 5)
. cyclohexane - chloroforme - méthanol (3:6:1).

Nous avons abandonné l'hexane, l'éther de pétrole et le benzène, trop peu éluants.

Le pouvoir d'élution du mélange-benzène- hexane-méthanol (7 : 2 : 1) est compris entre celui du benzène et celui du mélange benzène-méthanol, sans avantage particulier.

Nous avons finalement retenu :

S I benzène-méthanol (9: 1)
S II hexane-acétate d'éthyle (95 : 5)
S III chloroforme - cyclohexane-methanol (6:3:1)

Les spots ont été déposés à raison de 0,5 µl des essences pures et 0,5 µl des différents produits de référence dilués au demi dans l'hexane.

- *Révélateurs :*

Nous avons mis en expérience trois révélateurs :

R_1 : réactif à la dinitro-2,4 phénylhydrazine : solution saturée dans l'acide chlorhydrique 2 N.

La révélation est effectuée à froid ; les spots apparaissent orangés sur fond jaune pâle.

R_2: réactif au vanillal

Vanillal	1 g
Acide sulfurique concentré :	3 ml
Ethanol à 95c Q.S.....	100 ml

La pulvérisation de ce réactif est suivie d'un chauffage à l'étuve à 100°C pendant 4 mn. Par suite des grandes variations de couleurs obtenues on lit le chromatogramme 10 mn après la sortie de l'étuve.

R_3 : réactif au trichlorure d'antimoine : solution chloroformique saturée de trichlorure d'antimoine.

La pulvérisation est ici suivie d'un chauffage à 100°C pendant 2 mn. Les spots apparaissent en rose saumon et deviennent rapidement brunâtres.

Nous avons retenu les deux premiers révélateurs seulement, le troisième ne présentant guère d'intérêt ; les spots obtenus avec les carbures sont identiques à ceux que l'on obtient avec le réactif au vanillal et ne permettent pas, d'autre part, de différencier les essences de leur dérivés oxydés.

Le réactif au trichlorure d'antimoine permet toutefois l'identification du myrtanol très faiblement révélé par le vanillal, et du terpinéol, pour lequel il donne un spot rose très net de Rf 0,85, alors que le vanillal conduit à un spot peu visible.

Dans les tableaux rendant compte des chromatogrammes, les Rf indiqués entre parenthèses correspondent à des spots de très faible intensité, et les Rf soulignés, aux spots principaux ; les autres définissent les spots d'intensité moyenne.

II. CHROMATOGRAPHIE DES CARBURES ET DES DERIVES FONCTIONNELS TERPENIQUES.

A. CHROMATOGRAPHIE DES CARBURES.

1. p-cymène.

2. carbures terpéniques : myrcène, limonène, terpinolène :

Les spots sont indiqués tableau XV et schématisés figure II. On voit que les carbures étudiés, surtout le p-cymène et le myrcène, ont subi un début d'oxydation. A l'exception de ce dernier ils se présentent dans l'ensemble comme des mélanges.

Les solvants I et III ne permettent pas de bien les différencier ; par contre, on obtient avec le solvant II

SOLVANT	R_1				R_2			
	p-c	*M*	*L*	*T*	*p-c*	*M*	*L*	*T*
S I	(0,05) (0,11) (0,19) (0,22) (0,42) 0,55 0,58 0,70 0,76 0,90	0,36	(0,20), (0,40) (0,56) (0,69)	(0,19) 0,52	0,28 0,48 0,90	0,70	0,28 (0,40) 0,57	0,28 0,40 0,59
S II	(0,07) 0,15 0,21 0,28 0,36 0,44	(0,1) 0,66	(0,04) (0,13) (0,23)	(0,06)	0,22	0,45 (0,67) 0,94	0,95 (0,46) 0,68 (1)	0,95 0,80 (1)
S III	(0,44) (0,52) (0,66) 0,74 0,80 0,90	0,50	(0,25) (0,44) (0,54) (0,62)	(0,50) (0,63) (0,70) (0,76)	0,79 0,87 (1)	0,47 0,88 (1)	(0,77) 0,90 (1)	0,81 (1)

Tableau XV - Chromatographie du p-cymène (p-c) du myrcène (M), du limonène (L) et du terpinolène (T).

R_1 FIGURE II R_2

(p.C = p-Cymène, M = Myrcène, L = Limonène, T = Terpinolène)

SOLVANT	R_1				R_2			
	$\Delta_3 C$	α-P	β-P	C	$\Delta_3 C$	α-P	β-P	C
S I	(0,49)	0,62 (0,71) 0,91	0,65 (0,76) 0,85	Rien	(0,24) 0,35 (0,54) 1	(0,24) 0,35 0,45 0,69	0,35 0,49 (0,69) 1	0,35
S II	0 (0,11)	0 0,15 0,33 0,42	0 (0,07) (0,13) 0,20 (0,26) (0,31) (0,43)	0 (0,45)	0,12 1	0,12 0,24 0,50 0,60	0,12 0,24 0,34 0,50 0,60	0,12 0,42 1
S III	(0,77)	0,75 0,96	0,83 0,95	RIEN	0,81 0,9 0,94	0,79 0,88 0,92	0,35 0,81 0,93	1

Tableau XVI - chromatographie du Δ_3Carène (Δ_3C), des α et β-pinènes (α-P et β-P) et du Camphène (C).

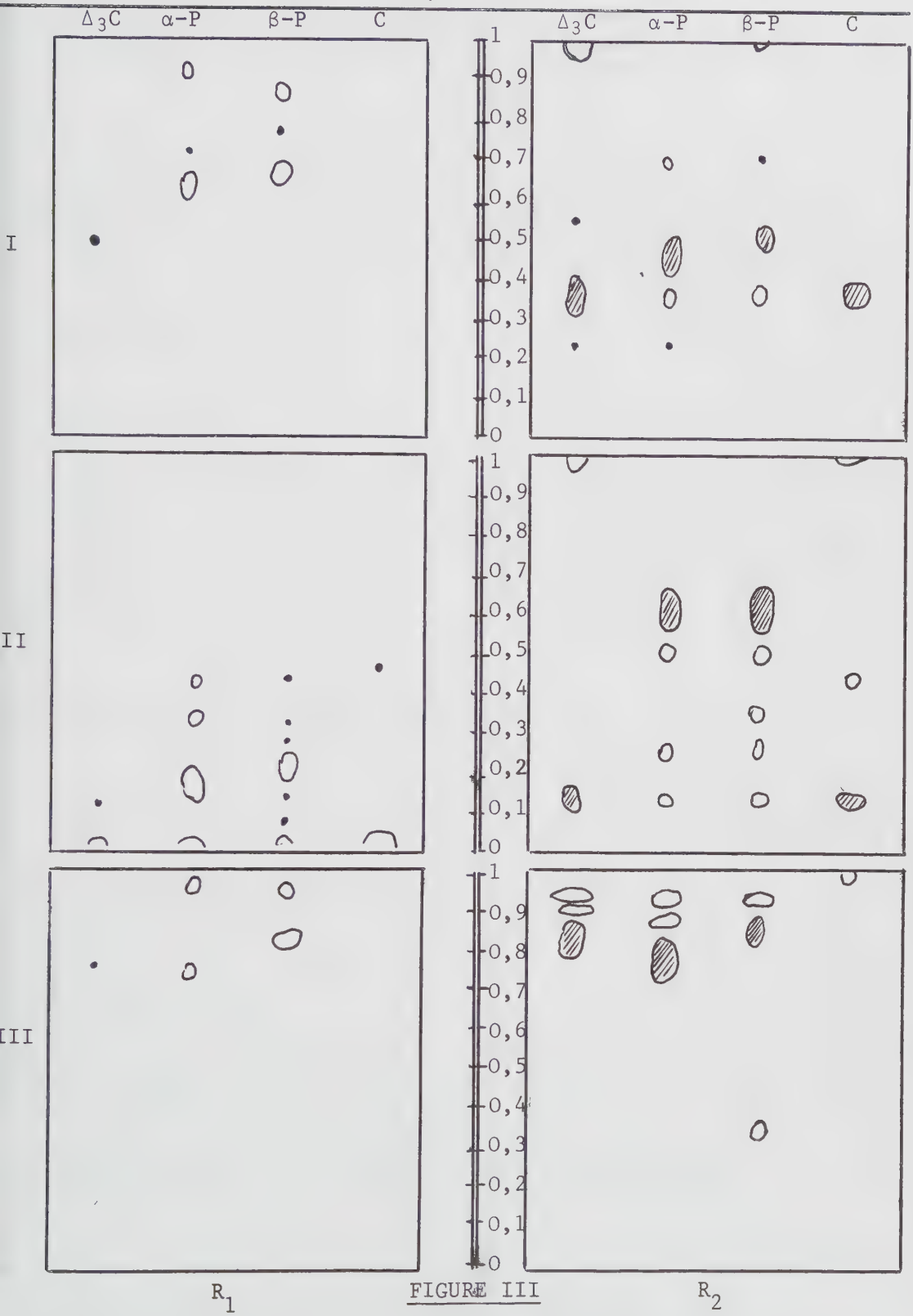


FIGURE III

(Δ_3C = Δ_3-carène, α-P = α-pinène, β-P = β-pinène, C = Camphène

	R1					R2				
	E	*T*	*P*	*Me*	*Ma*	*E*	*T*	*P*	*Me*	*Ma*
S I	Rien	(0,24) (0,28) (0,32) 1	0,87	0,87	Rien	0,70	(0,33) 0,47	0,48 (0,85)	0,43 (0,85)	0,5
S II	Rien	0	0,37	0,37	Rien	0,70	0,20 (0,55) 0,85	0,20 (0,55)	0,20 (0,55)	(0,23)
S III	Rien	0,48 (0,61)	0,33 0,53 0,97	(0,53) 0,97	Rien	1	(0,05) 0,18 0,69	(0,18) 0,66 (0,82)	0,63 (0,82)	(0,72)

Tableau XVII - Chromatographie de l'Eucalyptol (E) du Terpinéol (T), du Pinocarvéol (P), du Myrténol (Me) et du Myrtanol (Ma)

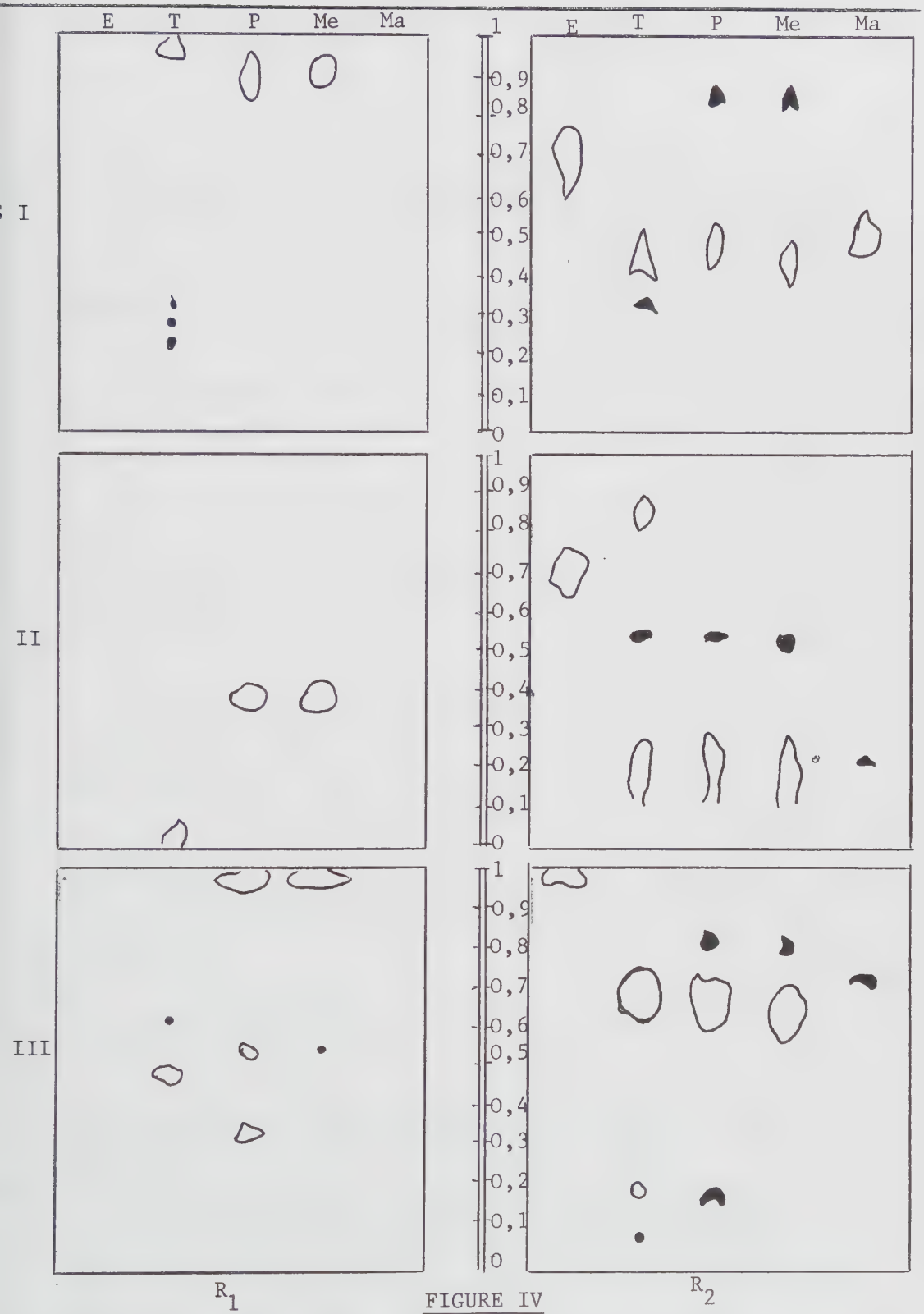


FIGURE IV

E= Eucalyptol, T=Terpinéol, P=Pinocarvéol, Me=Myrténol, Ma=Myrténal)

des spots assez bien individualisés. Nous retiendrons que, pour l'ensemble de ces carbures, le Rf est au-dessous de 0,6 avec le solvant I, (à l'exception du myrcène) au-dessus de 0,6 avec le solvant II et au-dessus de 0,75 avec le solvant III.

Les produits d'oxydation sont plus entraînés avec le solvant I qu'avec le solvant II.

3.Δ_3 -carène, α-pinène, β-pinène, camphène :

Les spots sont indiqués tableau XVI et schématisés figure III.

Les spots fournis par le vanillal sont colorés en bleu, bleu vert, mauve ou brun.

Comme dans le cas précédent, l'α-pinène et le β-pinène se montrent en réalité un mélange ; ils ne sont pas différenciables l'un de l'autre, et leur entraînement est facilité lorsque l'on passe du solvant I au solvant III.

Le Δ_3-carène et le camphène sont peu élués par les solvants I et II, avec lesquels ils donnent, surtout le second des traînées. Ces deux carbures sont, de plus, faiblement révélés par le vanillal. Leurs spots apparaissent par contre nettement par examen de la plaque en lumière de Wood à 360 mm, après pulvérisation du réactif.

Par comparaison avec les résultats obtenus avec les autres carbures (tableau XV) nous noterons que ces différents composés, s'ils sont en mélange dans une essence par exemple, ne seront pas identifiables séparément par ces techniques.

B. CHROMATOGRAPHIE DES DERIVES FONCTIONNELS.

1. Eucalyptol.

2. Alcools terpéniques : terpinéol, pinocarvéol myrténol, myrtanol.

Les spots sont indiqués tableau XVII et schématisés figure IV.

- La révélation à la dinitro-2,4 phénylhydrazine fait apparaître pour le pinocarvéol et le myrténol un spot de Rf = 0,87 dans S I ; 0,37 dans S II et 0,97 dans S III que l'on peut attribuer au myrténal (tableau XVIII) et que l'on retrouve moins intense par révélation au vanillal.

Après un certain temps d'exposition à l'air, les plaques traitées par la dinitro-2,4 phénylhydrazine laissent apparaître en jaune foncé sur fond jaune pâle, de nouveaux spots de même Rf que ceux qui sont révélés par le vanillal ; ils correspondent sans doute aux alcools eux mêmes, ayant subi "in situ" un début d'oxydation.

- La révélation au vanillal sulfurique permet d'obtenir pour les différents alcools, des chromatogrammes plus simples que dans le cas des carbures, présentant peu de spots parasites à l'exception de celui du myrténal dont nous avons déjà parlé : l'eucalyptol est en général pur et ne donne qu'un spot.

L'examen de ces chromatogrammes nous montre que :

- l'eucalyptol est mieux entraîné que les alcools
- les alcools sont mieux élués par S I que par S II, contrairement aux carbures, et se comportent donc comme les dérivés oxydés de ces derniers.
- le solvant S III se montre le plus éluant pour l'eucalyptol et pour les alcools, comme il l'était pour les carbures.

Si on compare les valeurs de Rf de l'eucalyptol des alcools et des carbures (tableaux XV, XVI, XVII) on constate que :

- le solvant S I ne permettra pas une bonne séparation des alcools et des carbures dont tous les Rf sont compris entre 0,35 et 0,60.

- le solvant S II par contre, éluant peu les alcools, donnera un bloc alcoolique de Rf voisin de 0,20, puis les carbures et l'eucalyptol dont les Rf sont entre 0,60 et 0,94.

- le solvant III entraînera les alcools entre Rf 0,63 et 0,69 les carbures entre Rf 0,77 à 0,88 et l'eucalyptol au front du solvant.

	R1				R2			
	M al	*V*	*C*	*HP*	*M al*	*V*	*C*	*HP*
S I	0,87	(0,27) 0,65 (0,83)	(0,27) (0,36) (0,65) 0,87	0,5 0,80	0,26 0,43 0,85	0,71 (0,88) (0,97)	0,53 0,88	0,52 0,72
S II	0,14 0,37	0,5 (0,7)	0 0,72	0,3 0,48	0,55	0,56 (0,86)	0,36 0,78	0,36 0,58
SIII	(0,61) (0,65) 0,97	(0,6) 0,92	0,82 0,91	0,79 0,92	(0,5) 0,82	0,95	(0,78) 0,95	0,80 (0,95)

Tableau XVIII - Chromatographie du Myrténal (M al) de la Verbénone (V), de la Carvone (C) et de l'hydroxy-2 pinanone-3 (HP).

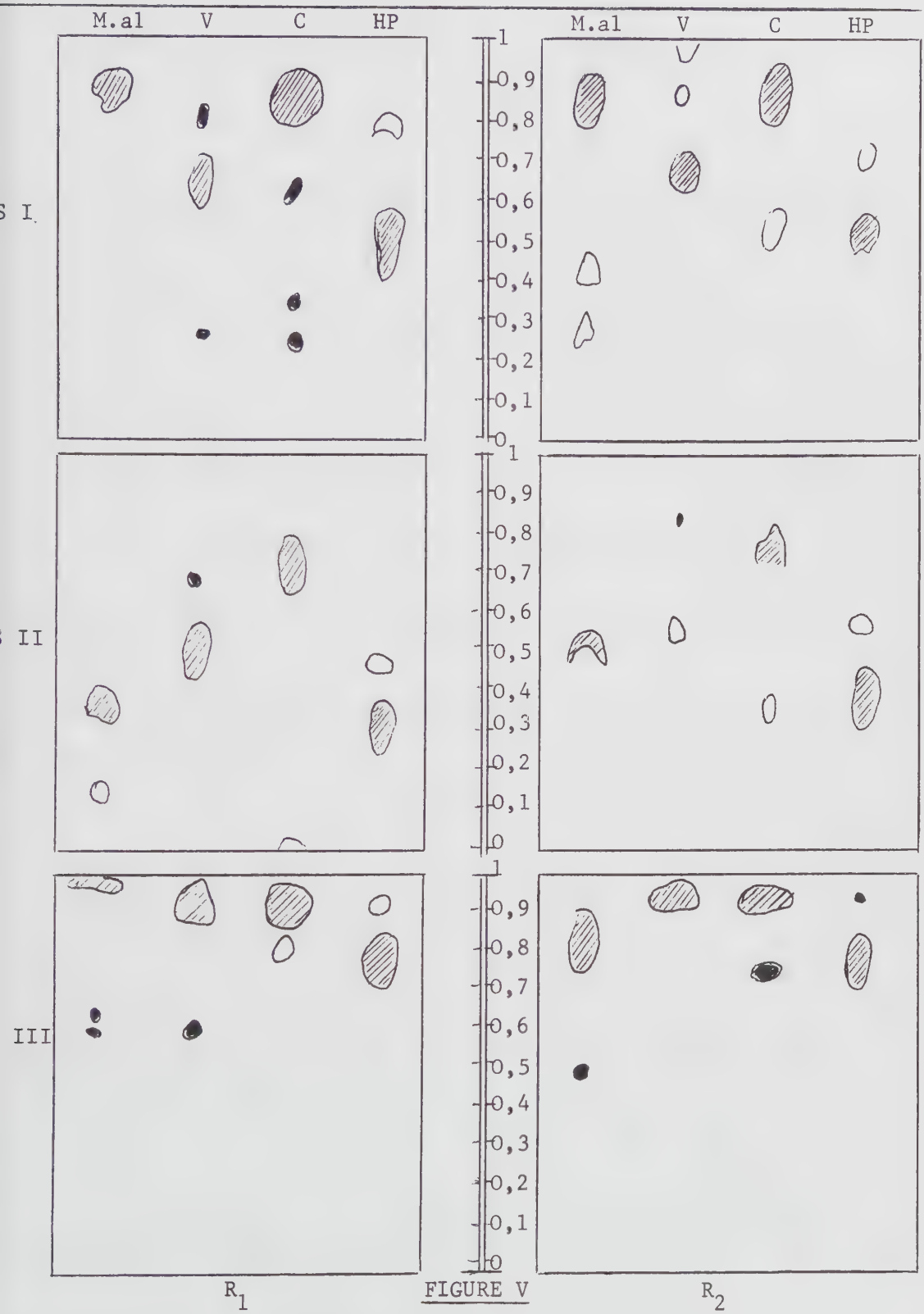


FIGURE V

.al = Myrténal, V = Verbénone, C = Carvone, HP = Hydroxy-2 pinanone-3)

Les spots de l'ensemble de ces composés présentent des colorations proches de celles des carbures.

3. Aldéhydes, cétones, acides :

- Myrténal, verbénone, carvone, hydroxy-2 pinanone-3 ou hydroxypinocamphone, acide pinonique.

L'acide pinonique a été étudié sous forme de pinonate de calcium en solution aqueuse acide ; il n'est révélé ni par le vanillal ni par le trichlorure d'antimoine et seul, le révélateur à la dinitro-2,4 phénylhydrazine fait apparaître un spot orangé, au départ, dans les trois solvants.

Les spots obtenus avec les autres composés sont indiqués tableau XVIII et schématisés figure V.

De l'examen de ces chromatogrammes il résulte que :

- l'hydroxy-2 pinanone 3 contient un peu de verbénone;
- la carvone contient de l'hydroxy-2 pinanone-3.

La verbénone est aisément identifiable par la coloration jaune de son spot. Les autres cétones présentent des colorations rouges ou rougeâtres.

Les cétones tranchent donc assez nettement sur l'ensemble carbure + alcools.

L'hydroxypinocamphone est moins entraîné que le myrténal et les autres cétones, dans les deux premiers solvants, et son Rf présente une valeur intermédiaire entre celui de ces composés et celui des alcools.

Dans leur ensemble, ces composés sont de mieux en mieux élués lorsque l'on passe du solvant II au solvant I puis au solvant III contrairement aux carbures, comme nous l'avons déjà signalé pour les autres composés oxygénés.

Nous pouvons comparer les Rf avec ceux des composés déjà étudiés :

- dans le solvant S I, l'élution se fait dans l'ordre suivant :

  . carbures, alcools et hydroxypinocamphone : Rf 0,35 à 0,60

. eucalyptol : Rf 0,70
. myrténal et cétones : Rf supérieurs à 0,70

- dans le solvant S II nous avons :

. alcools : Rf de l'ordre de 0,20
. hydroxypinocamphone : Rf : 0,34
. myrténal, verbénone : Rf 0,55 à 0,56
. carbures (Rf 0,60 à 0,80) eucalyptol (0,70) et carvone (Rf 0,78).

- dans le solvant S III nous avons :

. alcools : Rf 0,60 à 0,70
. carbures, myrténal, hydroxypinocamphone : Rf 0,80 à 0,90
. cétones et eucalyptol : Rf 0,90 à 1.

III. CHROMATOGRAPHIE DES ESSENCES ET DE LEURS DERIVES D'OXYDATION :

A. CHROMATOGRAPHIE DES ESSENCES DE PIN, DE NIAOULI ET D'EUCALYPTUS.

Les spots obtenus sont indiqués tableau XIX et schématisés figure VI.

Les essences ne sont pas révélées par la dinitro-2,4 phénylhydrazine.

La révélation au vanillal montre :

1°. dans le solvant S I.

- un gros spot commun aux trois essences de Rf compris entre 0,34 et 0,5 et que nous pouvons attribuer, d'après ce que nous avons vu aux paragraphes précédents, au bloc carbures + alcools.

- un spot commun aux essences d'Eucalyptus et de Niaouli dû à l'eucalyptol.

- quelques spots de Rf très élevés, pour les essences de Pin et de Niaouli, dont l'identification nous paraît incertaine.

Sol.	R1						R2					
	P	N	E	Po	No	Eo	P	N	E	Po	No	Eo
	0	0	0				(0,18)	(0,05)				(0,11)
				0,45	0,45	0,45	0,42	0,42	0,42			
										0,48	0,48	0,48
SI				0,54		0,53						
												0,66
				0,68	0,69							
				0,78	(0,78)	0,75						0,77
								0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
							(0,88)			0,88		
							(0,94)	0,94		0,94	0,94	0,94
							(0,96)			0,96		0,96
				0,98	0,98	0,98						
					(0,22)		0,23	0,23	0,23			
	0	0	0			0,28						
S				0,34	0,32	0,32				0,32	0,32	0,32
II					0,37	0,37						
				0,41								
				0,47			0,5					
										0,56	0,56	0,56
							0,75	0,75	0,75			
										0,78		0,78
										0,83	0,83	0,83
							(0,96)				0,97	0,97
							(0,2)			(0,2)		
				0,25	(0,25)			(0,26)				
	0	0	0						(0,28)	(0,32)	(0,30)	(0,28
					(0,33)	0,37			(0,35)	↓	↓	↓
				(0,47)	0,44	0,44	(0,46)			(0,46	(0,45)	(0,35
S										(0,52)		0,52
III											0,54	
							(0,57)			0,57		
										0,63	0,60	
							(0,68)				0,68	
								0,70	0,70			
							(0,73)			0,74		
				0,80	0,80	0,77	0,84	0,82	0,82	0,85	0,81	0,81
				(0,90)	0,90	0,90						
							(0,95)	0,95	0,95	0,94	0,95	0,95
				0,98	(0,98)	0,98				0,98	0,98	0,98

Tableau XIX - Chromatographie des essences de Pin (P), de Niaouli (N) et d'Eucalyptus (E) et de leurs dérivés d'oxydation (PO, NO, EO).

FIGURE VI

Chromatographie sur couche mince des essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus avant et après oxydation (P, N, E et P_o, N_o, E_o). (Révélation = Vanillal - J = jaune - r = rose)

2°. dans le solvant S II :

- deux spots communs aux trois essences :

. le premier de Rf 0,23 correspond aux alcools et aux carbures peu entraînés.

. le second, beaucoup plus important, est situé entre les Rf 0,67 et 0,9 et correspond à l'eucalyptol et à la majorité des carbures.

. deux spots supplémentaires pour l'essence de Pin de Rf 0,50 et 0,96.

3°. dans le solvant S III :

- pour l'essence de Pin, deux ou trois spots de Rf compris entre 0,73 et 1, attribuables aux carbures.
- pour les essences de Niaouli et d'Eucalyptus, un spot de Rf 0,82 dû aux carbures, un spot de Rf 0,96 attribuable à l'Eucalyptol et un spot de Rf 0,7 correspondant aux alcools.

B. CHROMATOGRAPHIE DES ESSENCES DE PIN, DE NIAOULI ET D'EUCALYPTUS OXYDEES.

Les spots obtenus sont indiqués dans le tableau XIX et schématisés figure VI.

La révélation au vanillal d'une part, à la dinitro 2,4-phénylhydrazine d'autre part, permet de différencier les essences de leurs produits d'oxydation et d'interpréter dans une certaine mesure les transformations qu'elles ont subies.

1°. dans le solvant S I,

On observe, avec le vanillal :

. l'augmentation considérable du spot représentant le bloc carbures + alcools.

. l'apparition de plusieurs spots de Rf élevés correspondant aux aldéhydes et aux cétones.

Plusieurs d'entre eux sont d'ailleurs révélés par la dinitro-2,4 phénylhydrazine, qui permet également l'obtention de deux spots de Rf mois élevés et pouvant correspondre, soit à des alcools secondairement oxydés, soit à une cétone du type hydroxypinocamphone moins entraînée que les autres.

Dans ces chromatogrammes nous retiendrons plus particulièrement un spot de Rf 0,80 qui apparaît en jaune vif, vraisemblablement dû à la verbénone et dont le caractère très visible et la constance permettent de différencier facilement les essences oxydées ou non.

2°. dans le solvant S II la révélation au vanillal montre :

. l'augmentation du spot relatif aux alcools,
. la diminution du spot dû aux carbures,
. l'apparition pour les trois essences d'un spot jaune très net de Rf 0,56 (sans doute dû à un dérivé d'oxydation du Δ_3-carène comme nous le verrons au chapitre VI), et pour les essences de Niaouli et d'Eucalyptus oxydées, d'un spot rose vif de Rf 0,97.

En chromatographiant les essences oxydées plus diluées on obtient plusieurs spots (en pointillé figure VI) notamment :

. un spot jaune de Rf 0,37 commun aux trois essences,
. un spot rose de Rf 0,32 qui n'est donné que par l'essence de Pin oxydée.

Le premier, également révélé par la dinitro-2,4 phényl-hydrazine pourrait être attribué à l'hydroxypinocamphone.

Nous avons en définitive trois spots qui semblent caractéristiques des essences oxydées.

3°. dans le solvant S III

on note pour les essences oxydées par rapport aux essences non oxydées l'apparition de spots de Rf immédiatement inférieurs dûs aux alcools et de Rf supérieurs dus aux aldéhydes et aux cétones,révélés également par la dinitro-2,4 phénylhydrazine.

Nous retiendrons :

. un spot rose vif de Rf 0,57 non identifié que nous avons trouvé uniquement dans l'essence de Pin oxydée.

. un spot jaune vif de Rf 0,95 qui semble dû à la verbénone et que nous avons retrouvé dans les trois essences oxydées.

EN CONCLUSION

La chromatographie sur couche mince permet d'individualiser, pour chaque essence avant son oxydation, les groupes de composés hydrocarbonés, alcooliques et carbonylés ; elle permet également une différentiation facile de ces essences et de leurs produits d'oxydation par la mise en évidence soit de l'augmentation du bloc alcoolique, soit surtout de l'apparition de composés cétoniques inexistants dans les essences non oxydées.

Enfin elle rend compte de la transformation des carbures terpéniques en alcools et cétones, soit par l'augmentation du spot (carbures + alcools) (solvant S I), soit surtout par l'augmentation du spot des alcools parallèlement à une diminution de celui des carbures (S II) et dans tous les cas par l'apparition de spots caractéristiques des aldéhydes et des cétones, révélables au vanillal ou à la dinitro-2,4 phénylhydrazine.

---°---

Chapitre IV

ANALYSE COMPAREE DES ESSENCES ET DES DERIVES D'OXYDATION PAR CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE

Nous étudierons successivement, comme pour la chromatographie sur couche mince, le p-cymène, les carbures terpéniques, les dérivés fonctionnels, les essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus, avant et après oxydation.

I. MODALITES TECHNIQUES.

Les conditions opératoires utilisées sont les suivantes :

Appareil : GIRDEL modèle 75 F S I
Colonne : . tube d'acier inox, diamètre 1/8 pouce longueur 3 m.
. support : chromasor W 80 - 100 mesh traité au diméthylchlorosilane,
. phase stationnaire : succinate de diéthylène - glycol à 4 %;
. température : 130°.
Injecteur : température : 190°
Détecteur : ionisation de flamme
température : 180°
débit d'hydrogène : 22 ml/mn.

Gaz vecteur : azote - débit : 9 ml/mn
Volume injecté : 0,1 µl
Enregistreur : déroulement du papier : 30 pouces/heure
Durée moyenne d'une analyse : 40 mn environ.

Nous avons été amenée à travailler à des atténuations différentes (signalées sur les enregistrements) selon la qualité des pics enregistrés.

Nous avons déterminé le temps de rétention relatif des principaux terpènes par rapport à l'α-pinène constituant commun aux trois essences.

II. *CHROMATOGRAPHIE DES CARBURES ET DES DERIVES FONCTIONNELS TERPENIQUES.*

1°. *p-cymène, et carbure terpéniques* (myrcène, limonène, terpinolène, Δ_3-carène, α et β-pinènes, camphène)

Les temps de rétention des principaux pics de ces chromatogrammes sont exprimés tableau XX.

Nous observons que :

1°. Les différents composés sortent de la colonne chormatographique dans l'ordre suivant :

α-pinène, camphène, β-pinène, myrcène, Δ_3-carène, limonène et terpinolène, p-cymène. Par cette technique le limonène et le terpinolène ne sont pas séparés.

2°. Ces différents carbures ne sont pas purs et se présentent dans l'ensemble comme des mélanges.

Le p-cymène, de t R 4 comporte de plus un pic de tR 3,14 et un pic de tR 8,8 . Il pourrait s'agir pour le premier d'un carbure isomère et pour le second d'un dérivé phénolique ; nous retrouvons en effet ces deux pics et celui du p-cymène conjointement lors de l'oxydation des α-pinène, β-pinène et Δ_3-carène, comme nous le verrons au chapitre VI.

p-C	*M*	*L*	*T*	$\Delta_3 C$	*αP*	*βP*	*C*
		0,7	0,7				0,7
					1	1	
		1,29	1,29			(1,29)	
					(1,42)		
							1,6
						1,7	
	2						
	2,14			2,14			
		2,4	2,4				
		2,54	2,54	2,54	(2,54)	2,54	
3,14				3,14			
		3,57	3,57				
4				4		4	
8,80					8,8	8,8	
						10,29	
					13,57		
					18,75	18,75	
					21,00	21,00	
					(24,14)	24,14	
					26,29	26,20	
						31,42	
					(38,60)	38,57	
					42,14		

Tableau XX - Chromatographie gazeuse du p-cymène et des carbures terpéniques.

(Temps de rétention relatifs du p-cymène (p-c) du mycène (M) du limonène (L) du Terpinolène (T) du Δ_3-carène (Δ_3 C) des α et β-pinènes (α-P et β-P) et du camphène par rapport à l'α-pinène).

Le myrcène et le camphène sont assez purs ; le second comporte un pic de tR très court non identifé que l'on retrouve dans le limonène et le terpinolène.

Ces deux derniers carbures ne sont pas séparés et comportent un assez grand nombre de pics parasites.

Le Δ_3-carène comporte deux pics de tR 3,14 et 4 que l'on peut attribuer au p-cymène et à un de ses isomères et un pic de tR 2,54 que l'on retrouve également dans les chromatogrammes du limonène et du terpinolène, de l'α et du β-pinènes.

Le β-pinène contient en outre de l'α-pinène. Ces deux carbures sont accompagnés de dérivés d'oxydation, vraisemblablement alcooliques, aldéhydiques d'après leurs temps de rétention (myrténal : tR 24) ainsi que cétoniques dans le cas de l'α-pinène (verbénone de tR 42).

2°. Dérivés fonctionnels : eucalyptol, myrténol, myrténal, myrtanol, pinocarvéol, terpinéol, carvone, verbénone, hydroxy-2 pinanone-3 (ou hydroxypinocamphone).

L'acide pinonique n'a pas été chromatographié à cause de son caractère fortement polaire. Les temps de rétention obtenus avec les autres composés sont réunis dans le tableau XXI.

. Eucalyptol.....	3
. Terpinéol.....	15,16 - 19,33 - 26,33
. Myrtanol.....	49,71
. Myrténol.....	38,5
. Pinocarvéol.....	18,8 - 22
. Myrténal.....	24
. Carvone.....	22 - 42,1
. Verbénone.....	41,7
. Hydroxypinocamphone :	97

Tableau XXI

Nous avons chromatographié deux échantillons différents d'hydroxypinocamphone :

. l'un s'est montré pur et n'a donné qu'un pic de tR 97
. l'autre a donné 4 pics de tR respectifs 22,41 - 41,7 et 97, ce qui est en faveur de la présence dans cet échantillon de pinocarvéol et de verbénone.

Dans l'ensemble ces dérivés fonctionnels se montrent plus purs que les carbures étudiés précédemment.

L'Eucalyptol donne toujours un seul pic,
Le Terpinéol présente trois pics d'intensité croissante qui correspondent peut être aux trois isomères α, β, γ .

Le Pinocarvéol montre également deux pics d'inégale grosseur comme la carvone dont le pic supplémentaire possède un tR correspondant au pic principal du pinocarvéol.

Ces dérivés sont élués dans l'ordre suivant :

. Eucalyptol
. Pinocarvéol et terpinéol
. Aldéhyde (myrténal)
. Myrténol
. Cétones
. Alcool saturé (Myrtanol)
. Hydroxypinocamphone

III. CHROMATOGRAPHIE DES ESSENCES ET DE LEURS DERIVES D'OXYDATION.

Les chromatogrammes obtenus sont représentés figures 7, 8, 9, et 10 et les temps de rétention correspondant aux pics tableau XXII.

Avant leur oxydation, les essences se présentent sous forme d'un mélange de carbures.

L'essence de Pin comporte peu de pinènes ; elle est surtout constituée de Δ_3-carène (tR 2,14), du bloc limonène + terpinolène (tR 2,4) et de p-cymène (tR 4) ; les essences de Niaouli et d'Eucalyptus sont assez semblables ; on y trouve des carbures, α et β-pinènes (tR 1 et 1,7) limonène et terpinolène (tR = 2,4), p-cymène,

surtout dans l'essence de Niaouli, et une grosse quantité d'eucalyptol dans les deux (tR = 3).

Chez les trois essences on observe un pic de tR 26,33 correspondant au terpinéol, ainsi que quelques pics de dérivés oxydés (tR 8,8 - 11,6), rares dans les essences récentes.

Le chromatogramme des essences oxydées est considérablement modifié et fort complexe.

On observe la diminution des carbures précités mais la persistance du p-cymène ; un grand nombre de pics de dérivés oxydés apparaissent et, en particulier les pics de tR 13,57 - 18,75 - 21 - 24, 14,42 et 97 pour les trois essences ; de tR 21 surtout pour les essences de Niaouli et d'Eucalyptus ; de tR 55 et 132 surtout pour l'essence de Pin.

Le pic de tR 13,57 n'a pas été identifié, mais on le retrouve dans les α et β-pinènes avant et après oxydation et dans le Δ_3-carène oxydé comme nous le verrons au Chapitre VI.

Les autres pics peuvent être attribués au pinocarvéol (tR 18,75 et 21), au myrténal (tR 24,14), à la carvone ou à la verbénone (tR 42,14), à l'hydroxypinocamphone (tR 97).

Les pics de tR et 132, présents dans l'essence de Pin, n'ont pas été identifiés, mais prouvent vraisemblablement que cette essence subit une oxydation plus poussée que les autres.

En somme, les chromatogrammes permettent de définir quelques pics caractéristiques de l'oxydation des essences et de vérifier la présence d'alcools, d'aldéhydes et de cétones.

----°----

P	*N*	*E*	P_o	N_o	E_o
I	I	I		I	I
1,71	1,7	1,7			1,7
2,15					
	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
2,5					
	3	3	3	3	3
3,92	3,9	3,9			
			4	4	4
	5,50				
			7		
8,83	8,83		8,8	(8,8)	(8,8)
			9,33		
11,16	11,16		11,16	11,16	11,16
			13,5	13,5	13,5
15,16	15,16	15,2		14,7	14,7
			(16)	(16)	(16,2)
	19,30				
19,33		19,33	18,7	18,7	18,7
			(21)	21	21
			24,2	24,2	24,1
26,33	26,33	26,33			
				36,5	36,5
			42	42	41
			55	55	55
			60	60	60
			97	97	97
			132		

Tableau XXII - Chromatographie en phase gazeuse des essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus (temps de rétention par rapport à l'α-pinène).

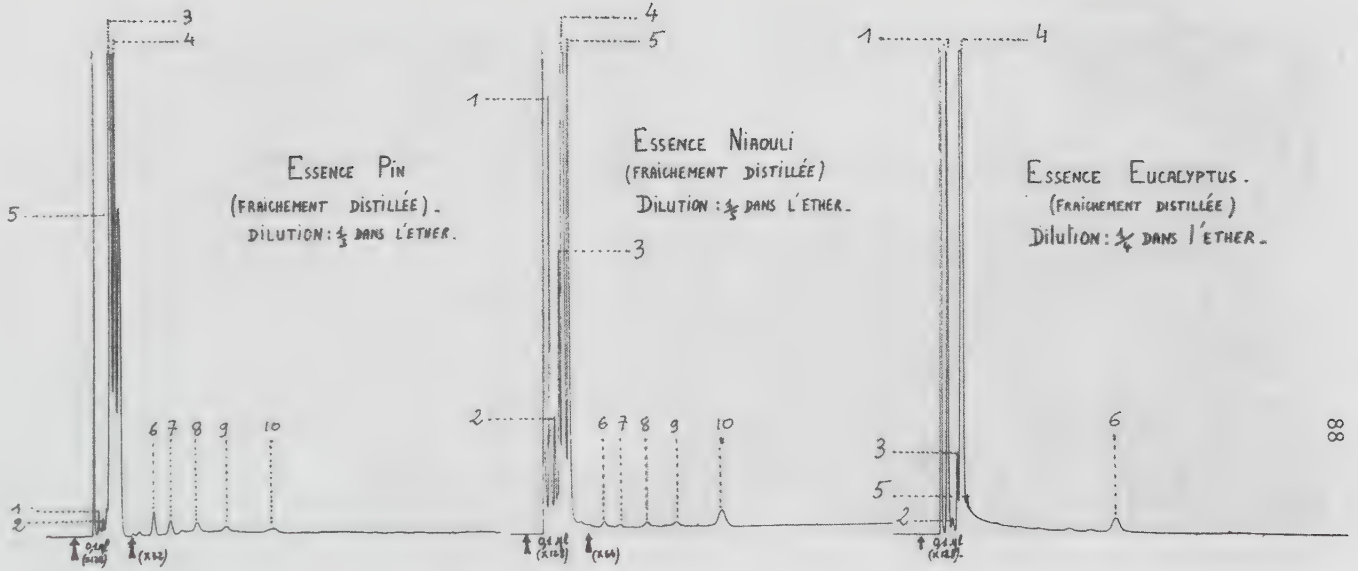


FIG. n° 7 - TEMPS DE RETENTION

	ESSENCE DE PIN		ESSENCE DE NIAOULI		ESSENCE D'EUCALYPTUS	
1.	1	α-pinène	1. 1.	α-pinène	1. 1	α-pinène
2.	1,7	β-pinène	2. 1,7	β-pinène	2. 1,7	β-pinène
3.	2,15	Δ_3-carène	3. 2,4	limonène-terpinène	3. 2,4	limonène-terpinène
4.	2,5	limonène-terpinène	4. 3	eucalyptol	4. 3	eucalyptol
5.	3-9	p-cymène	5. 3,9	p-cymène	5. 3,9	p-cymène
6.	8,8		6. 8,8		6. 26,3	terpinéol
7.	11,16		7. 11,16			
8.	15,16		8. 15,16			
9.	19,3	terpinéol	9. 19,35	terpinéol		
10.	26,33		10. 26,33			

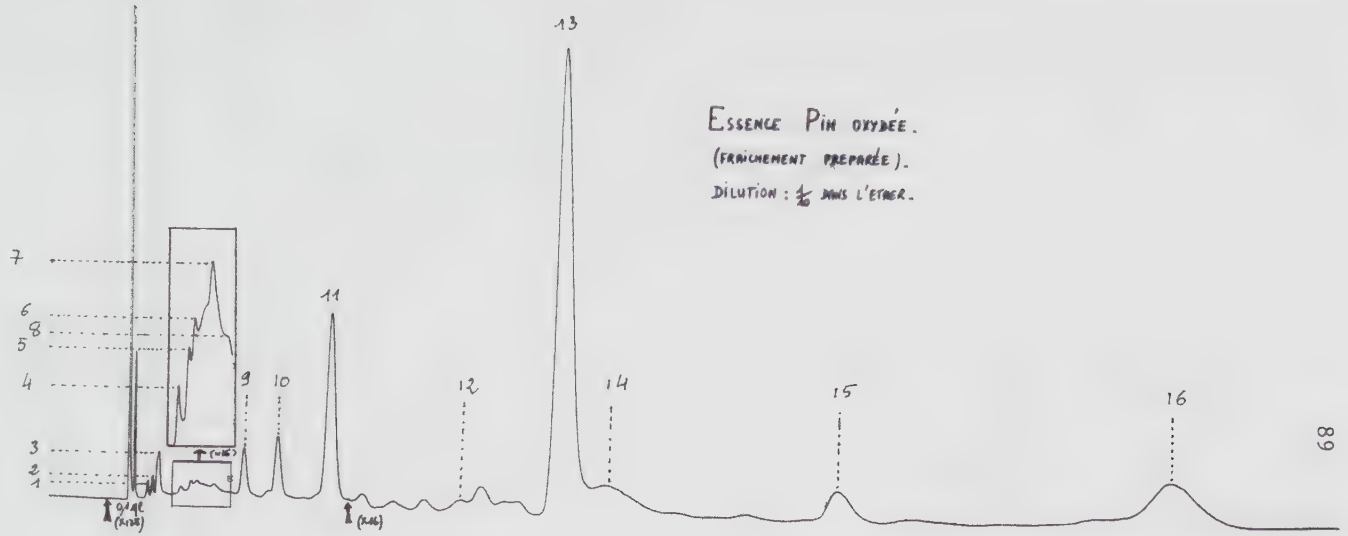


FIG. n° 8 - TEMPS DE RETENTION

1.	2,4	limonène-terpinène	
2.	3		
3.	4	p-cymène	
4.	7		
5.	8,8		
6.	9,3		
7.	11,1		
8.	12		
9.	13,5		
10.	18,7	pinocarveol	
11.	24,2	myrténal	
12.	42	verbénone-carvone	
13.	55		
14.	60		
15.	97	hydroxy-2 pinanone-3	
16.	132		

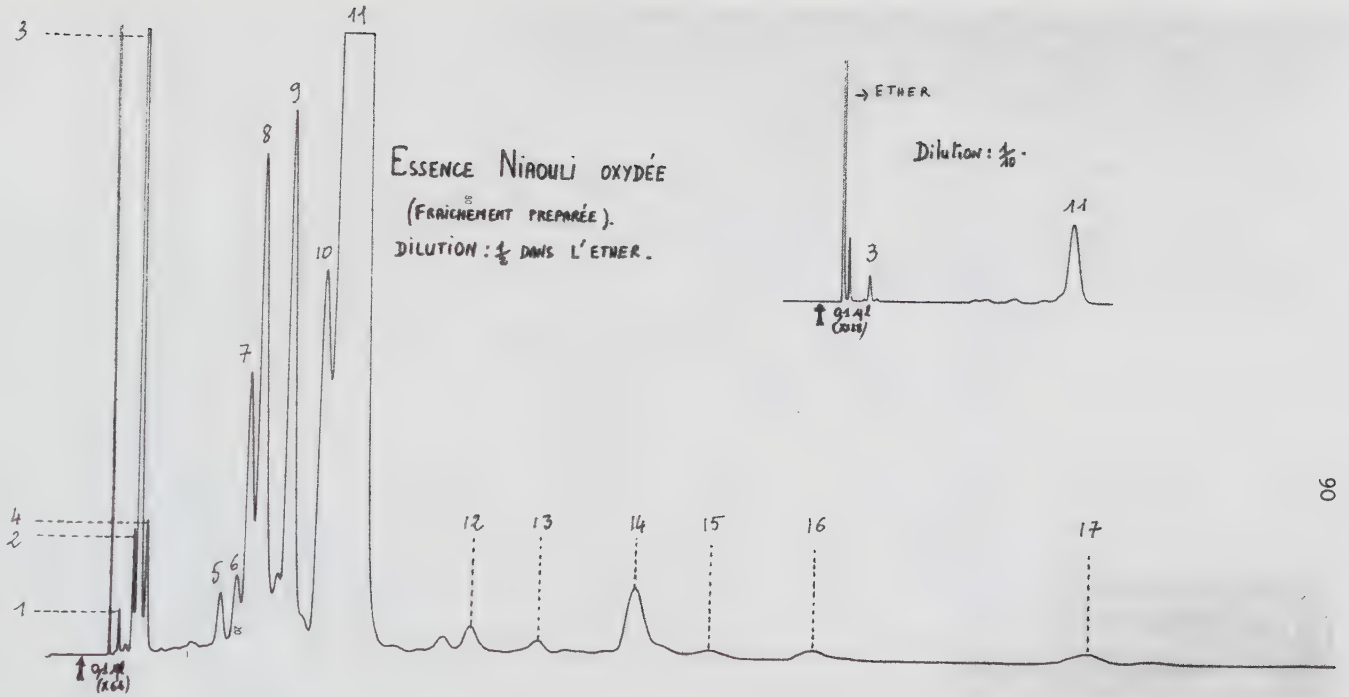


FIG. n° 9 - TEMPS DE RETENTION

1. 1	α-pinène	9. 18,7	pinocarvéol
2. 2,4	limonène-terpinène	10. 21	
3. 3		11. 24,2	myrténal
4. 4	p-cymène	12. 36,5	
5.11,1		13. 42,2	verbénone-carvone
6.12		14. 55	
7.13,5		15. 60	
8.14,7		16. 69	
		17. 97	hydroxypinocamphone

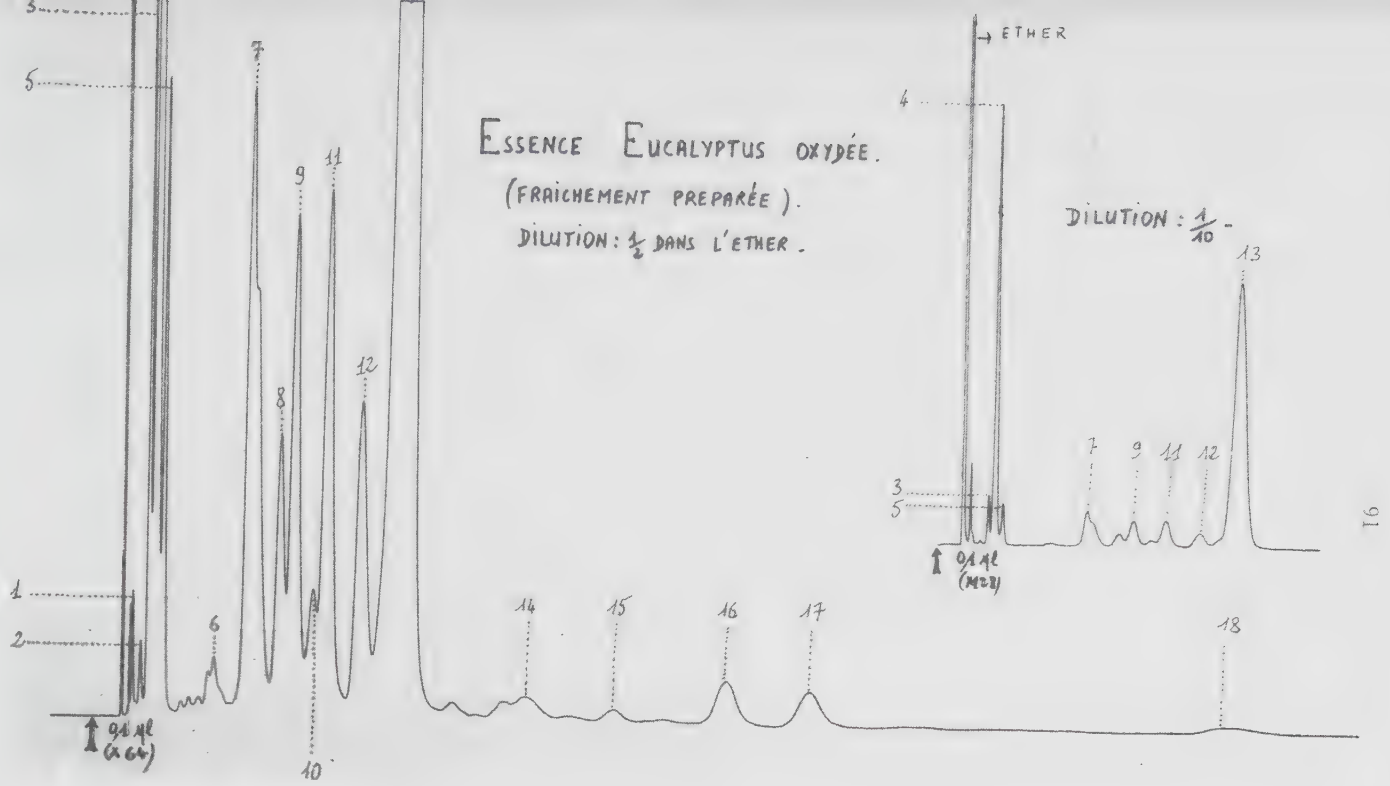


FIG. n° 10 - TEMPS DE RETENTION

1. 1	α-pinène	7. 11,1		13. 24,1	myrténal
2. 1,7	β-pinène	8. 13,5		14. 36,5	
3. 2,4	limonène-terpinène	9. 14,7		15. 42	verbenone-carvone
4. 3	eucalyptol	10. 16,1		16. 55	
5. 4	p-cymène	11. 18,7	pinocarvéol	17. 60	
6. 8,8		12. 21		18. 97	hydroxypinocamphone

Chapitre V

ETUDE DES ESSENCES AUTOXYDEES SPONTANEMENT

Afin de comparer les dérivés obtenus par voie catalytique et par autoxydation des essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus, nous avons chromatographié un certain nombre d'essences plus ou moins anciennes conservées au laboratoire à la température ordinaire.

La chromatographie sur couche mince ne permet pas une différenciation nette des essences et de leurs dérivés d'autoxydation spontanée. On note cependant quelques différences, surtout marquées pour l'essence de Pin et en particulier la disparition quasi totale du spot de Rf 0,23 relatif aux alcools dans le solvant II pour l'essence de Pin récente ainsi que des petits spots non identifiés compris entre Rf 0,20 et Rf 0,68 dans le solvant S III.

Ces spots réapparaissent par vieillissement de l'essence.

On remarque que les spots retenus comme caractéristiques de l'oxydation catalytique n'apparaissent pas, à l'exception toutefois d'une trace de Rf 0,57 dans le solvant S III.

Les cétones qui se forment par autoxydation catalytique de l'essence de Pin, semblent donc absentes des produits d'autoxydation spontanée, qui semble plutôt conduire à la formation d'alcools.

La chromatographie en phase gazeuse permet au contraire de mettre en évidence l'apparition dans le temps de produits d'oxydation.

Les figures 11, 12, représentent les chromatogrammes d'essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus conservées cinq ans au laboratoire à la température ordinaire.

On remarque la présence dans les essences d'Eucalyptus et de Niaouli de pics de tR supérieurs à 19 absents dans les essences récentes et en particulier les pics de tR 21, 24,14 et 42,14 observés aussi lors de l'autoxydation catalytique ; le pic de tR 59,3 n'existe que dans l'essence de Pin oxydée et semble provenir du Δ_3 -carène.

On n'obtient jamais le pic de tR = 97 caractéristique de l'hydroxypinocamphone.

Il semble donc que l'autoxydation spontanée des essences étudiées conduise à l'obtention de certains produits alcooliques ou aldéhydiques d'après leurs temps de rétention, identiques à ceux résultant de l'autoxydation catalytique.

Par contre, les essences vieillies ne présentent que très peu de composés cétoniques, qui sont donc caractéristiques des essences autoxydées par voie catalytique.

---°---

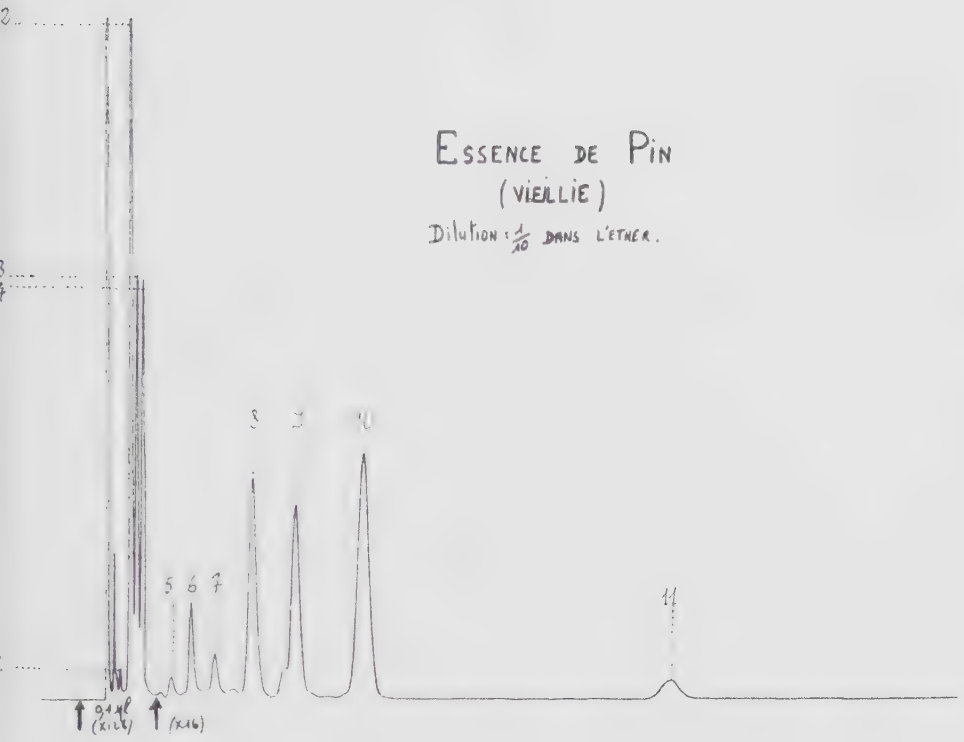


FIG. n° 11 - TEMPS DE RETENTION

1.	1	α-pinène	7. 11,1	
2.	2,14	Δ_3-carène	8. 13,5	
3.	2,4	limonène-terpinène	9. 18,7	pinocarvéol
4.	3,95	p-apmène	10. 24	myrténal
5.	7		11. 55	
6.	8,8			

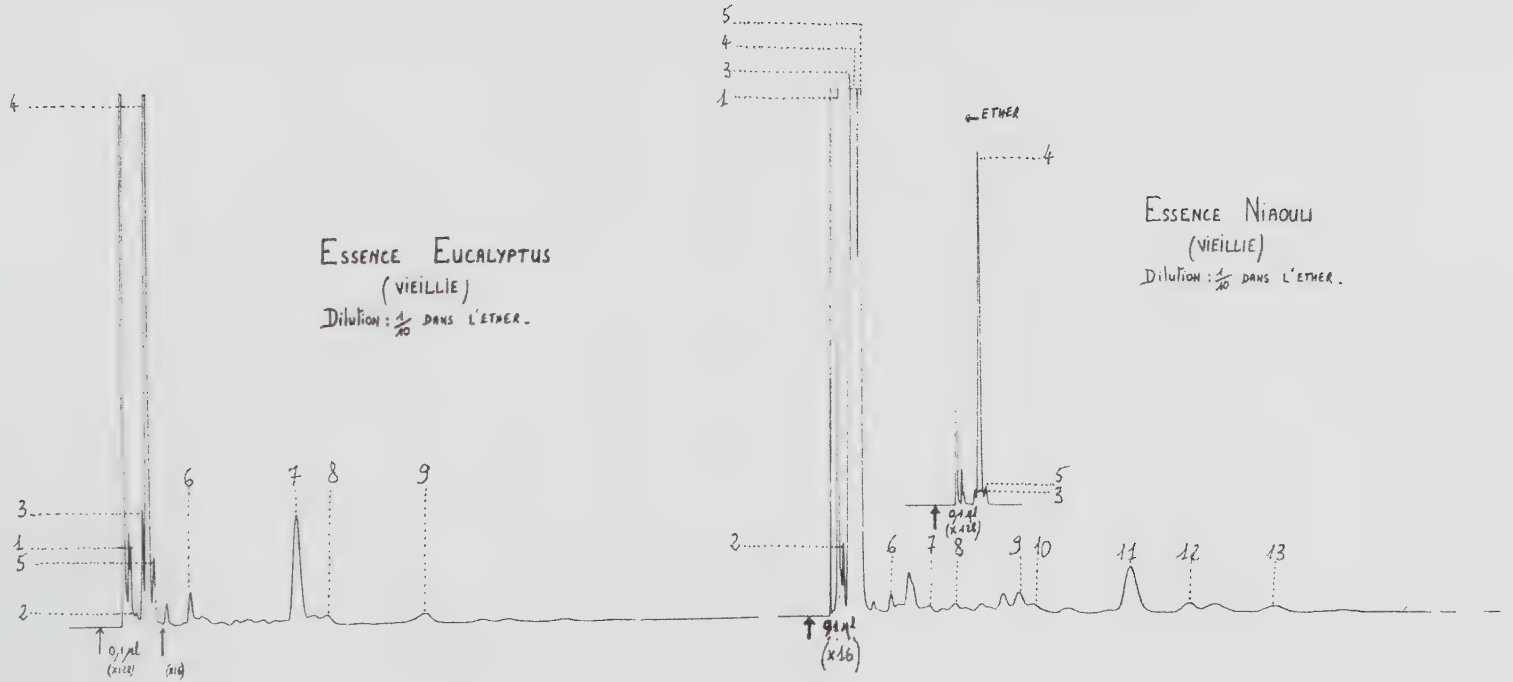


FIG. n° 12 - TEMPS DE RETENTION

ESSENCE EUCALYPTUS VIEILLIE

1.	1	α-pinène
2.	1,7	β-pinène
3.	2,4	limonène-terpinène
4.	3	Eucalyptol
5.	4	p-cymène
6.	8,8	
7.	21	pinocarvéol
8.	24,1	myrténal
9.	36,5	

ESSENCE DE NIAOULI VIEILLIE

1.	1	α-pinène
2.	1,7	β-pinène
3.	2,4	limonène-terpinène
4.	3	Eucalyptol
5.	4	p-cymène
6.	8,8	
7.	11,1	
8.	13,5	
9.	21	pinocarvéol
10.	24	
11.	36,5	
12.	42	verbénone-carvone
13.	55	

Chapitre VI

ETUDE DES DERIVES OXYDES DE QUELQUES CARBURES TERPENIQUES

Afin de rechercher l'origine des spots obtenus lors de la chromatographie des essences nous avons oxydé dans les mêmes conditions quatre carbures terpéniques l'α-pinène, la β-pinène, le Δ_3-carène et le camphène.

Nous les avons étudiés avant et après oxydation par chromatographie sur couche mince et par chromatographie gazeuse ; dans le cas des dérivés oxydés nous avons chromatographié les deux fractions de distillation (1ère Partie, Chapitre III, page 19).

I. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.

La chromatographie a été réalisée dans les solvants S II et S III ; nous avons révélé par la dinitro-2,4 phénylhydrazine et par le vanillal. Les chromatogrammes obtenus sont décrits dans le tableau XXIII et schématisés figure 13-14.

Nous n'avons pas fait figurer le camphène car, après oxydation son chromatogramme ne présente aucun spot.

Les différents chromatogrammes nous montrent que :

1°. les premières fraction de distillation des carbures oxydés sont semblables aux carbures d'origine, ce qui n'est pas surprenant puisqu'ils en sont les constituants. On entraîne cependant parfois des traces de composés oxydés.

α et β pinènes

SOLVANT	R1 αP	R1 αP2	R1 βP	R1 βP2	R2 αP	R2 αP1	R2 αP2	R2 βP	R2 βP1	R2 βP2
SII	0,15	0,12	(0,07) (0,13)		0,12	0,12		0,12	0,12	
		0,18	0,20	0,21			0,24			0,24
		0,28	(0,26)	0,28						(0,27)
	0,33	0,37	(0,31)	0,37			0,35			(0,37)
	0,42	0,40	(0,43)	0,42			0,44			0,42
										0,47
										0,55
					0,60	0,60		0,60	0,60	
							I		(0,92)	0,92
S III								0,18		(0,23)
							0,26			(0,26)
										(0,4)
	0,75			0,66			0,7	0,72	0,72	0,7
		0,82	0,83	0,82	0,8	0,79	0,8	0,79		0,8
						0,84		0,83	0,82	
							0,9			
	0,96		0,95	0,95			0,94			0,95
		0,97		0,97			0,98	0,98		0,98

Δ3 carène

	Δ3 C	Δ3 C2	Δ3 C	Δ3 C1	Δ3 C2
S II	0,11		0,11	0,11	
		0,25	0,20	(0,20)	0,20
				(0,33)	0,32
		0,37			0,38
		0,42		(0,44)	
				(0,53)	0,48
					(0,56)
					0,91
			I	I	0,97
S III					0,44
					0,71
	0,77	0,82	0,81	0,81	0,80
					0,9
					0,92
		0,97	(0,96)	0,96	0,99

Tableau XXIII - Chromatographie des α et β-pinènes (αP - βP) du Δ3-carène (Δ3 C) et de leurs produits d'oxydation (1° fraction = αP1 βP1, Δ3C1 et 2° fraction = αP2 βP2 Δ3 C2).

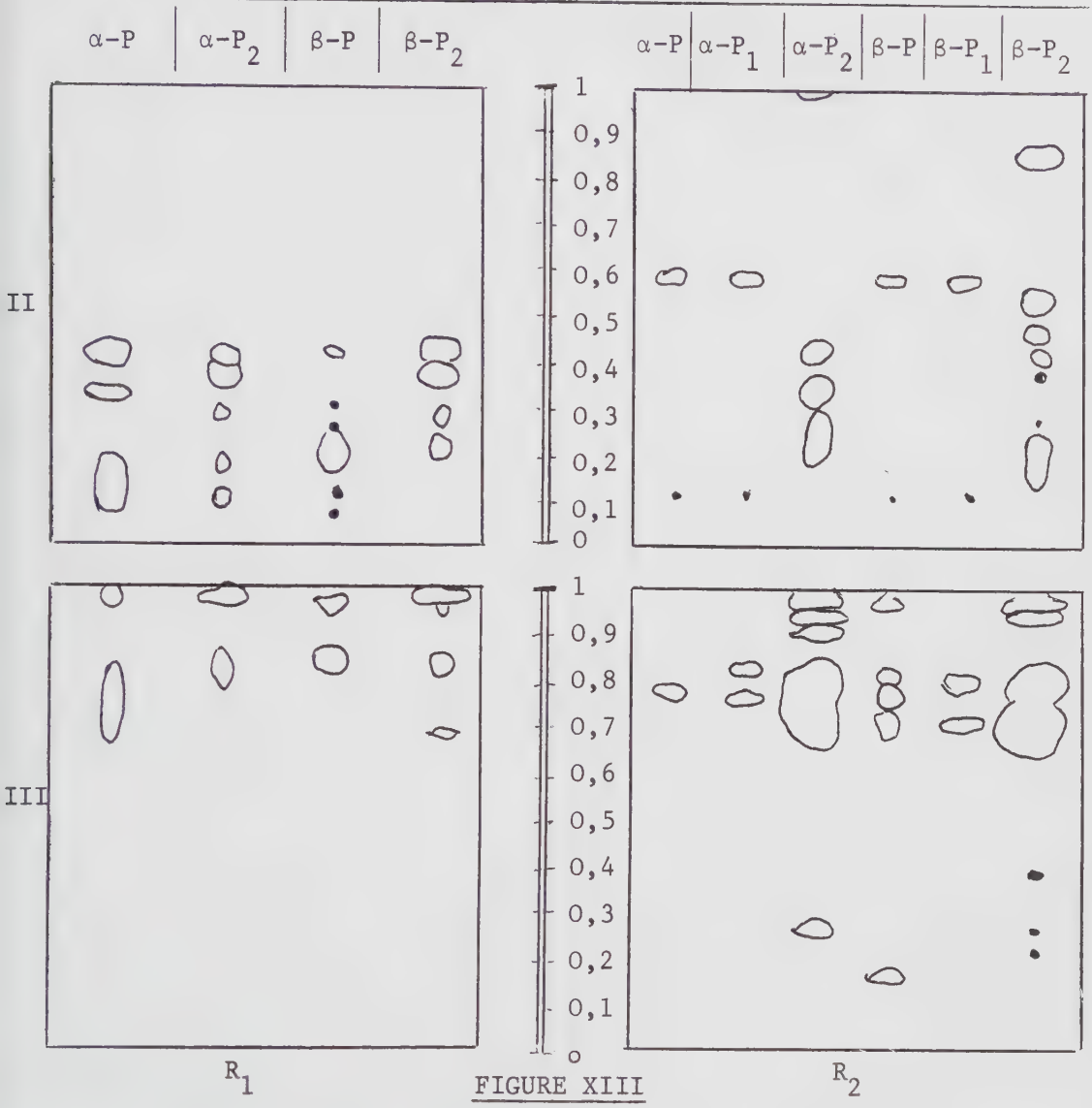


FIGURE XIII

Chromatographie sur couche mince des α et β-pinènes
(Les chiffres 1 et 2 indiquent les fractions de distillation des carbures oxydés)

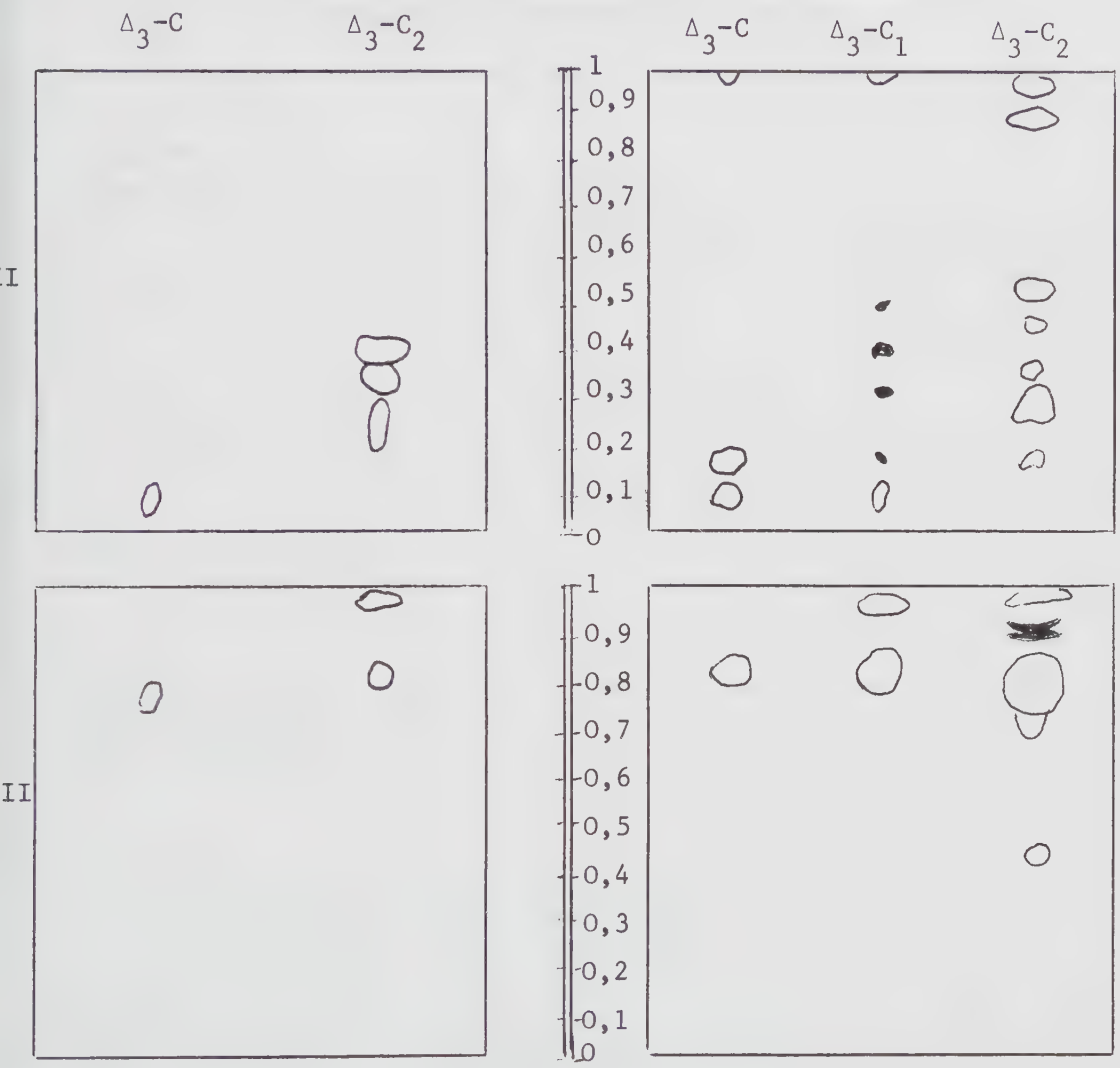


FIGURE XIV

romatographie sur couche mince du Δ_3-carène avant et après oxydation
s chiffres 1 et 2 indiquent les fractions de distillation des carbures
ydés.)

dans S II :β-pinène oxydé : spot de Rf 0,85

Δ_3-carène oxydé : spots de Rf 0,33, 0,44 - 0,53

dans S III Δ_3-carène oxydé : spot de Rf 0,96

2°. Les trois carbures présentent après oxydation une fraction alcoolique de Rf 0,20-0,25 dans S II et de Rf 0,7 dans SIII puis une fraction aldéhydique et cétonique de Rf 0,35 - 0,45 dans S II et de Rf 0,8-1 dans S III. Ces résultats sont confirmés par la dinitro-2,4 phénylhydrazine.

3°. Les trois carbures oxydés possèdent un grand nombre de spots communs dans les deux solvants, et en particulier dans S III, un spot jaune de Rf 0,95 que nous avons déjà décrit lors de l'étude des essences oxydées et qui n'existe pas dans les essences d'origine.

L'α-pinène et le β-pinène oxydés possèdent dans S II un spot jaune commun de Rf 0,35 que nous avons également trouvé dans les essences oxydées et que l'on pourrait attribuer à l'hydroxypinocamphone ; le Δ_3-carène oxydé montre dans le même solvant un spot également jaune très intense non révélé par la dinitro-2,4 phénylhydrazine dont le Rf 0,56 et la couleur permettent de penser qu'il est identique à celui que l'on observe au même Rf dans les chromatogrammes des essences oxydées.

Nous avons retenu ces deux spots comme critère de différenciation des essences avant et après leur oxydation. Enfin, l'α-pinène et le β-pinène oxydés se différencient nettement dans S II par l'existence, chez le second d'un spot rose vif de Rf 0,92, absent chez le premier. Le même spot est donné très nettement par les essences de Niaouli et d'Eucalyptus oxydées et très faiblement par l'essence de Pin oxydée, ce qui est en accord avec la faible teneur enβ-pinène de l'essence de Pin.

4°. Certains spots se retrouvent chez les trois carbures avant et après leur oxydation :

- les spots de Rf 0,40 - 0,42 dans S II
  0,96 - 0,97 dans S III

pour les α et β-pinènes révélés par la dinitro-2,4 phénylhydrazine.

- les spots de Rf 0,20 dans S II
0,96 dans S III

pour le Δ_3-carène révélé par le vanillal.

II. .CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

Nous avons étudié le Δ_3-carène, l'α-pinène, le β pinène et le camphène avant et après leur oxydation.

Les deux fractions de distillation ont été chromatographiées (Première partie - chapitre III, p. 19).

Le camphène, comme en chromatographie en couche mince, ne révèle plus aucun pic après son oxydation.

Le Δ_3-carène, les α et β-pinènes nous ont donné des chromatogrammes représentés figures 15, 16, 17, 18 dont les temps de rétention sont indiqué tableau XXIV.

On peut formuler les commentaires suivants :

1°. Les α et β-pinènes donnent après leur oxydation une première fraction de distillation dont le chromatogramme est celui des carbures d'origine. On décèle cependant des traces de dérivés oxydés.

pour l'α-pinène : pics de tR 1,85
4
3,14

les deux derniers étant ceux du p-cymène et de l'un de ses dérivés.

Pour le β-pinène : pics de tR 3,14
13,57
42,14

le dernier correspondant à la carvone ou à la verbénone.

On note également dans les deux cas une diminution du pic de tR 21 et pour l'α-pinène une augmentation du pic de tR = 1,42.

2°. Le Δ_3-carène donne au contraire une première fraction de distillation très modifiée par rapport au carbure d'origine, contenant une forte proportion de p-cymène (tR 4) et de son dérivé de tR = 3,14, ainsi qu'un

FIG. n° 15 (ci-contre)

TEMPS DE RETENTION

α-pinène

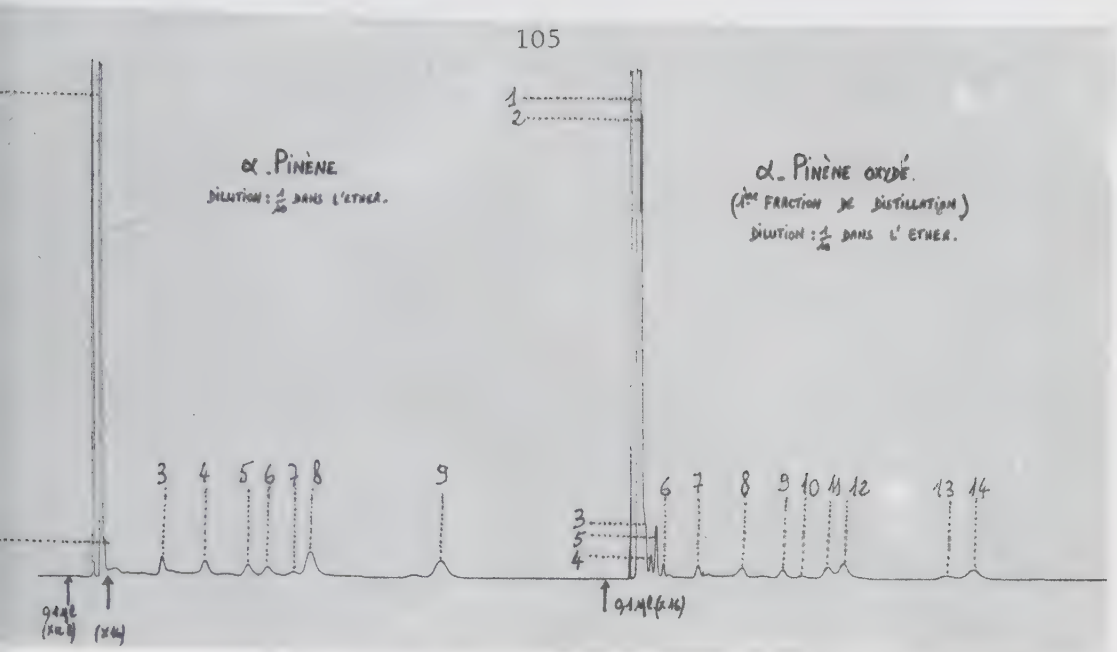
1. 1	α-pinène	5. 18,7	pinocarvéol
2. 1,4		6. 21	
3. 8,4		7. 24,1	myrténal
4. 13,5		8. 26,3	
		9. 42,1	verbénone-carvone

α-pinène oxydé
(1ère fraction de distillation)

1. 1	α-pinène	8. 13,5	
2. 1,4		9. 18,7	pinocarvéol
3. 1,85		10. 21	
4. 2,5	limonène-terpinène	11. 24,L	myrténal
5. 3,14		12. 26,3	
6. 4	p-cymène	13. 38,6	myrténol
7. 8,4		14. 42,1	verbénone-carvone

α-pinène oxydé
(2ème fraction de distillation)

1. 1	α-pinène	7. 18,7	pinocarvéol
2. 1,85		8. 24,1	myrténal
3. 3,14		9. 26,3	
4. 4	p-cymène	10. 28,6	
5. 8,4		11. 42,1	verbénone-carvone
6. 13,5		12. 97	hydroxypinocamphone


α. PINÈNE
DILUTION : 1/20 DANS L'ETHER.
α. PINÈNE OXYDÉ.
(1ère FRACTION DE DISTILLATION)
DILUTION : 1/20 DANS L'ETHER.
1
2
3 4 5 6 7 8 9
3
5
4
6 7 8 9 10 11 12 13 14
(x4)
(x4)

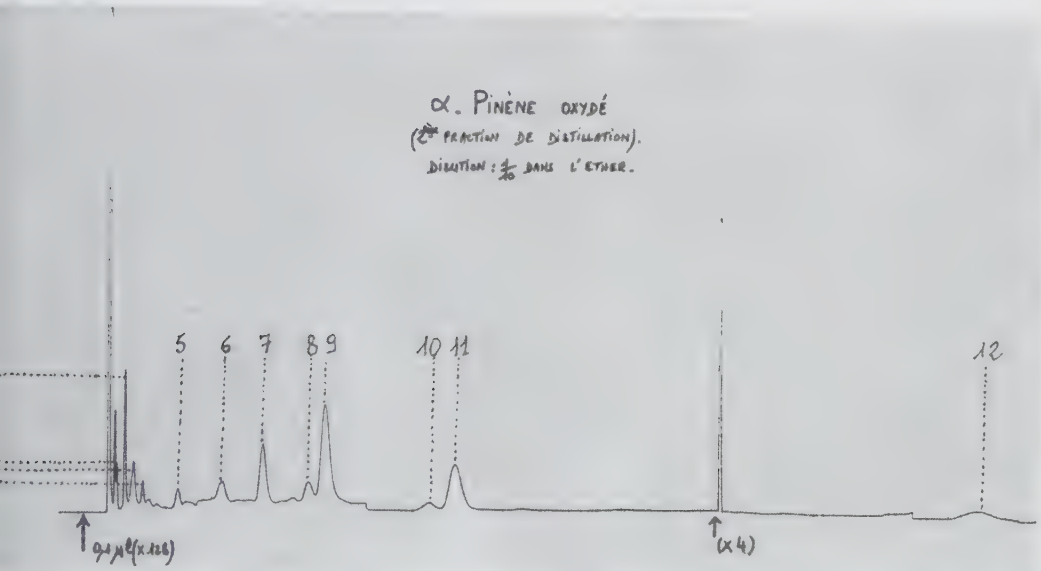

α. PINÈNE OXYDÉ
(2ème FRACTION DE DISTILLATION).
DILUTION : 1/20 DANS L'ETHER.
5 6 7 8 9 10 11 12
(x4)

FIG. n° 15

FIG. n° 16 (ci-contre)

TEMPS DE RETENTION

β-pinène

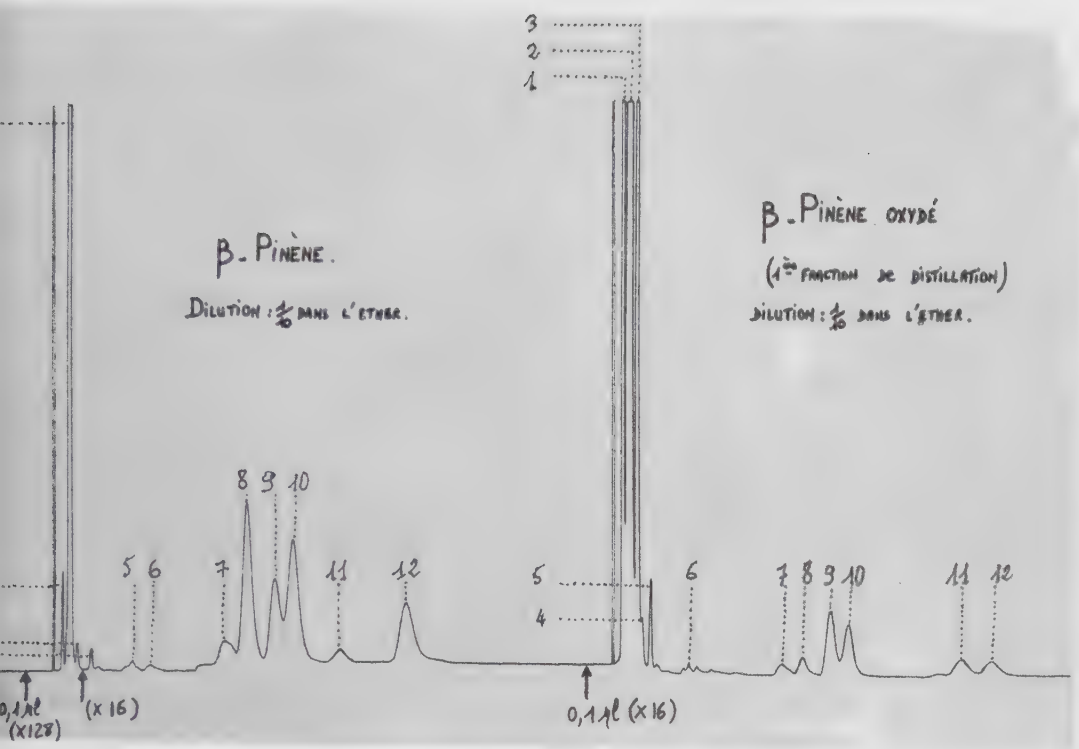
1.	1	α-pinène	7.	18,7	pinocarvéol
2.	1,7	β-pinène	8.	21	
3.	2,5	limonène-terpinène	9.	24,1	myrténal
4.	4	p-cymène	10.	26,1	
5.	8,4		11.	31,4	
6.	10,3		12.	38,6	myrténol

β-pinène oxydé
(1ère fraction de distillation)

1.	1	α-pinène	7.	18,7	pinocarvéol
2.	1,7	β-pinène	8.	21	
3.	2,5	limonène-terpinène	9.	24,1	myrténal
4.	3,1		10.	26,1	
5.	4	p-cymène	11.	38,6	myrténol
6.	8,4		12.	42,1	verbénone-carvone

β-pinène oxydé
(2ème fraction de distillation)

1.	1	α-pinène	10.	24,1	myrténal
2.	1,7	β-pinène	11.	26,1	
3.	2,5	limonène-terpinène	12.	31,3	
4.	3,1		13.	36,1	
5.	4	p-cymène	14.	38,6	myrténol
6.	8,4		15.	42,1	verbénone-carvone
7.	13,5		16.	50,4	
8.	18,7	pinocarvéol	17.	60	
9.	21		18.	97	hydroxypinocamphone


β-Pinène.
Dilution : 1/10 dans l'éther.
β-Pinène oxydé
(1ère fraction de distillation)
Dilution : 1/10 dans l'éther.
0,1 µl (x128)
(x 16)
0,1 µl (x16)

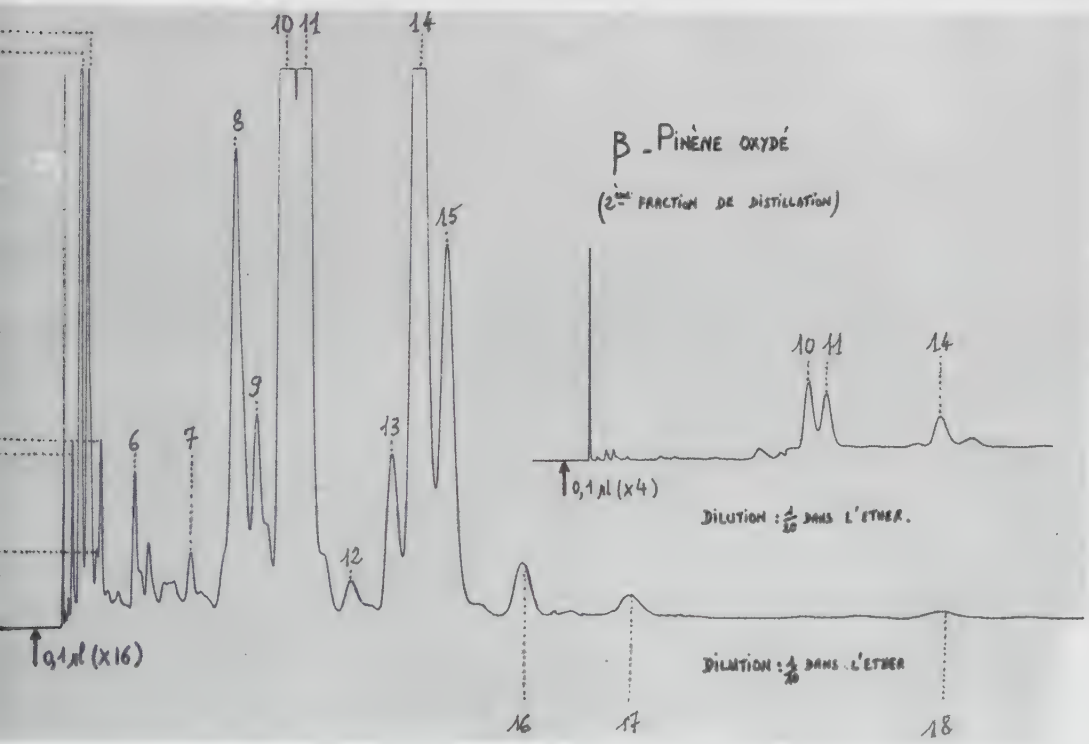

β-Pinène oxydé
(2ème fraction de distillation)
0,1 µl (x4)
Dilution : 1/10 dans l'éther.
0,1 µl (x16)
Dilution : 1/10 dans l'éther

FIG. n° 16

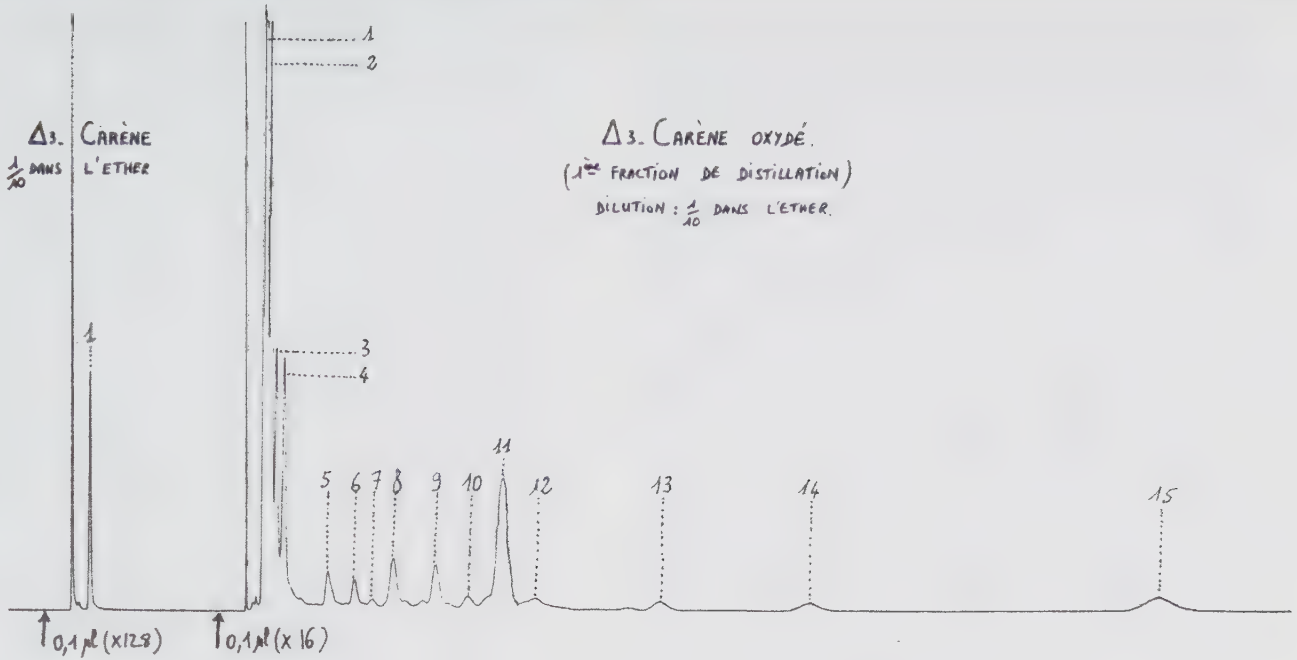


FIG. n° 17 - TEMPS DE RETENTION

1.	2,14	Δ_3-carène	9.	20,8	
2.	2,5	limonène-terpinène	10.	24	myrténal
3.	3,14		11.	26,5	
4.	4	p.cymène	12.	30,6	
5.	8,5		13.	42,2	verbénone-carvone
6.	11,4		14.	56	
7.	13,4		15.	97	hydroxypinocamphone
8.	15,5				

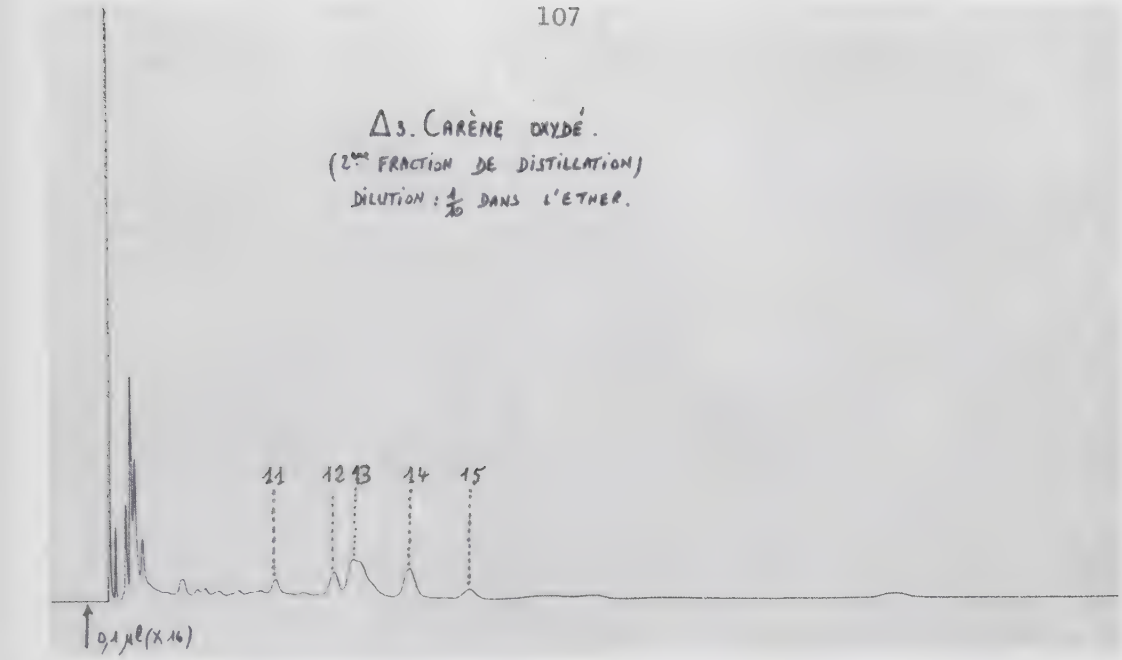
FIG. n° 18 (ci-contre)

Δ_3-carène oxydé

(2ème fraction de distillation)

Temps de rétention

1.	1,6	
2.	2,5	limonène-terpinène
3.	4	p-cymène
4.	8,5	
5.	9,8	
6.	11,4	
7.	13,3	
8.	15,6	
9.	16,8	
10.	18,5	pinocarvéol
11.	21	
12.	26,2	
13.	30,7	
14.	37,5	
15.	42,2	verbénone-carvone
16.	56	
17.	96	hydroxypinocamphone


Δ3. CARÈNE OXYDÉ.
(2ème FRACTION DE DISTILLATION)
DILUTION : 1/10 DANS L'ETHER.
11
12
13
14
15
0,1 µl (X 16)

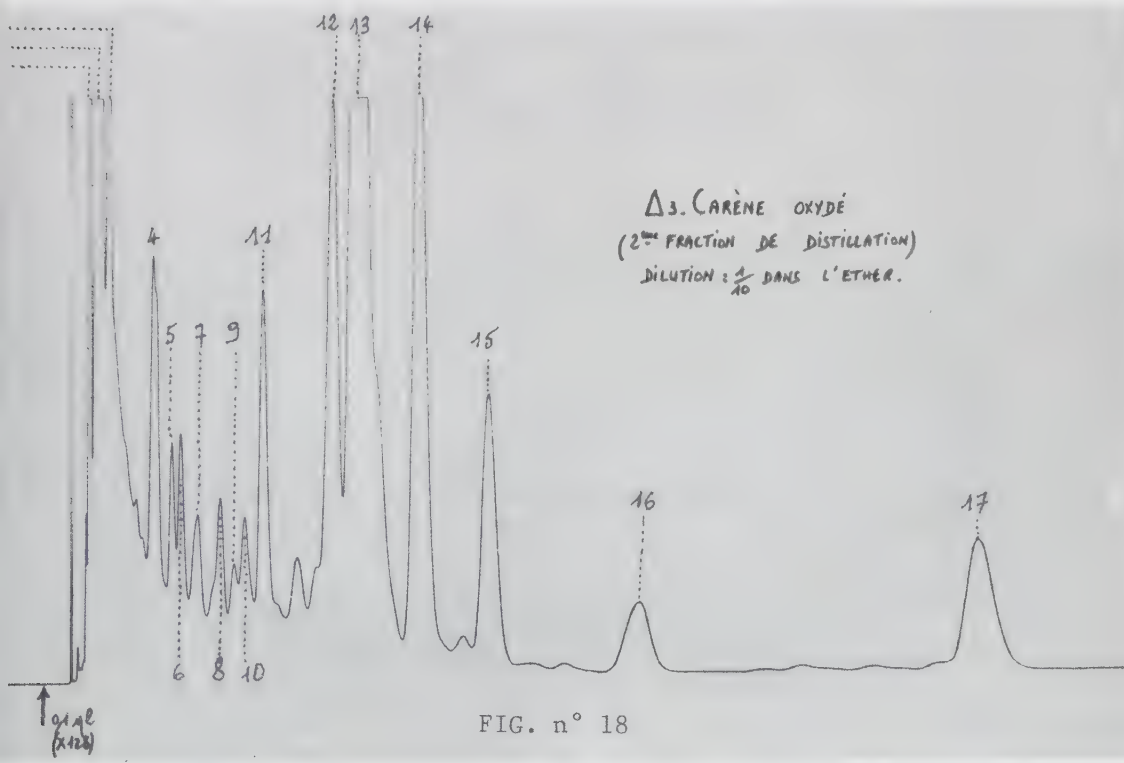

Δ3. CARÈNE OXYDÉ
(2ème FRACTION DE DISTILLATION)
DILUTION : 1/10 DANS L'ETHER.
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

FIG. n° 18

$\Delta_3 C$	$\Delta_3 C_I$	$\Delta_3 C_{II}$	αP	αP_I	αP_{II}	βP	βP_I	βP_{II}
	0,69	0,69						0,70
	I		I	I	I	I	I	I
						1,29		
			(1,42)	1,42				
		1,62						
						1,7	1,7	1,7
				1,85	1,85			
2,14	2,14							
(2,54)	2,54	2,54	(2,54)	(2,54)		2,54	2,54	2,54
(3,14)	3,14			(3,14)	3,14		3,14	
4	4	4		(4)	4	4	4	4
	8,78							
		8,80		8,80	8,80	8,80	8,80	8,80
			8,81					
		9,85						
						10,29		
	11,40	11,40						
	13,50	13,50						
			13,57	13,57	13,57			
							13,60	13,60
	15,57	15,56						
		16,85						
		18	18,75	18,75	18,75	18,71	18,70	18,75
		20	20					
				(21)	(21)	21	21	21
	23,43	23,43	24,14	24,14	24,14	24,14	24,14	24,14
	27	27	26,29	26,29	26,29	26,14	26,14	26,14
	30,57	30				31,42		31,3
		36,57						36
			(38,6)	(38,6)	38,6	38,57	38,6	38,6
		40,85						
	43	43	42,14	42,14	42,14		42,14	42,14
								50,4
	59,4	59,4						
								62,1
		90,85						
	96,5	96,5						
					97			(97)

Tableau XXIV - Chromatographie en phase gazeuse du Δ_3-carène ($\Delta_3 C$) et des α et β-pinènes (αP et βP) (fractions I et II de distillation) avant et après oxydation

certain nombre de dérivés d'oxydation absents dans le carbure d'origine et communs avec ceux des α et β-pinènes.

3°. Les deuxièmes fractions de distillation comportent des pics pré-existant dans les carbures d'origine et des pics nouveaux.

a) les pics pré-existant sont :

- diminués : ce sont surtout les carbures de départ, qui persistent toutefois dans la deuxième fraction de distillation à l'exception du Δ_3-carène.

- augmentés : c'est le cas des pics de tR 2,54 18,7 - 24,14 - 26,14 - 38,6 pour le β-pinène ; 4 - 18,7 26,2 - 42,14 pour l'α-pinène ; 3,14 et 4 pour le Δ_3-carène; correspondant au pinocarvéol (18,7) au myrténol (38,6) au myrténal (24,14) au p-cymène et à un dérivé (4 et 3,14).

Certains sont donc communs aux différents carbures.

La pré-existence de certains pics semble traduire une modification spontanée des carbures par oxydation, en donnant certains dérivés similaires à ceux de l'oxydation provoquée par notre procédé.

- inchangée par l'oxydation

pour l'α-pinène = les pics de tR 8,29-8,4
13,57
21
24,14
38,6

pour leβ-pinène les pics de tR 8,29 -8,4
21

Les pics de tR 24,14 et 38,6 correspondent respectivement au myrténal et au myrténol ; on peut en déduire que ces composés se forment non pas à partir de l'α-pinène, mais plutôt à partir du β-pinène, pour lequel on observe en effet une très forte augmentation du myrténol et du myrténal.

b) les pics nouveaux résultent de phénomènes d'oxydation ou d'isomérisation des carbures.

. pics de tR 3,14 - 4 et 97 pour l'α-pinène (p-cymène et un dérivé, hydroxypinocamphone),
. pics de tR 31,3 - 36,1 - 42,14 (carvone ou verbénone) 50,4, 62 et 97 (hydroxypinocamphone) pour le β-pinène.
. pics de tR supérieur à 4 pour le Δ_3-carène. (En particulier pic de tR 59,4 absent des chromatogrammes de l'α et du β-pinène oxydés, et que l'on retrouve en forte proportion sur celui de l'essence de Pin oxydée).

Un grand nombre de pics sont communs aux trois carbures (t R 4 - 42,14 -97).

En conclusion si cette étude ne nous a pas permis d'identifier tous les produits d'oxydation des carbures étudiés, elle révèle cependant l'origine d'un certain nombre de pics observés dans les essences oxydées.

Elle montre l'isomérisation partielle de ces carbures en p-cymène, très marquée pour le Δ_3-carène, et la formation de quelques dérivés fonctionnels.

---°---

TROISIEME PARTIE

CONTROLE DES MEDICAMENTS A BASE D'ESSENCES OXYDEES

---°---

Les essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus oxydées ont fait l'objet de travaux récents d'ordre toxicologique, pharmacodynamique et clinique.

L'étude chimique et analytique que nous venons d'exposer nous a permis de mettre au point les contrôles physico-chimiques des médicaments qui en dérivent. Ils sont tous à base d'un mélange à partie égales des trois essences oxydées, qui constitue l'une des matières premières.

---°---

Chapitre I

APPLICATIONS THERAPEUTIQUES

L'étude toxicologique, pharmacodynamique et clinique des essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus oxydées a conduit aux observations suivantes :

1. Le coefficient thérapeutique est très favorable.

Les toxicités aiguës et chroniques chez l'animal (rat, lapin) sont faibles, à des doses très nettement supérieures à celles prévues par l'utilisation thérapeutique.

2. Les dérivés oxydés présentent une activité bactériostatique et bactéricide vis-à-vis de nombreuses bactéries ; leur association à la streptomycine aboutit in vitro à une activité de type synergique.

3. L'élimination de ces dérivés (78) administrés par voie veineuse ou rectale s'effectue par voie pulmonaire.

L'expérimentation a été réalisée chez le lapin , par prélèvement de l'air expiré, en continu, ou par tranches de 25 mn toutes les heures.

- Après injection intra-veineuse, l'élimination pulmonaire est immédiate ; elle augmente rapidement; elle est maximale entre 1 et 2 h puis décroît pour s'annuler aux environs de la 6ème heure.

La quantité éliminée par cette voie représente alors au bout de 6 heures environ 25 à 30 % de la quantité perfusée.

La voie rectable conduit également à une élimination pulmonaire débutant 2 heures environ après l'administration, et se poursuivant de façon uniforme et plus étalée dans le temps que dans le cas précédent.

4. Les dérivés oxydés exercent une action favorable sur la pénétration à travers les membranes et la peau.

5. L'étude clinique montre qu'ils possèdent une activité anti-thermique, anti-infectieuse et balsamique, ainsi que des propriétés décongestionnantes. Ils facilitent l'action réparatrice des muqueuses. Ces propriétés les rendent utilisables dans le traitement de certaines affections aiguës et chroniques des voies respiratoires ainsi que dans les affections rhinologiques.

6. En ce qui concerne les voies d'administration, ils se montrent utilisables par voie orale, rectable, parentérale ou transmuqueuse (pulvérisations nasales).L'un de leurs principaux avantages réside dans leur hydrosolubilité qui rend possible la préparation de solutions aqueuses, et d'autre part, améliore leur pénétration dans l'organisme. Mélangées à parties égales, les trois essences oxydées entrent dans la formule de différentes formes pharmaceutiques qui, pour la plupart d'entre elles contiennent en outre de la terpine. Leur composition relative à ces deux principes actifs est donnée tableau XXV.

	Mélange des trois essences oxydées p. 100 ou par suppositoire	*Terpine %*
Soluté injectable (ampoule de 5 ml)	0,10 g	0,10 g
Suppositoires adultes enfants nourrissons	 0,05 g 0,025 g 0,015 g	 0,03 g 0,02 g 0,01 g
Soluté nasal	o,10 g	
Sirop	0,135 g	0,20 g

Tableau XXV - Composition des formes pharmaceutiques étudiées (essences oxydées et terpine).

---°---

Chapitre II

CONTROLE PHYSICO-CHIMIQUE DU MELANGE DES TROIS ESSENCES OXYDEES

Le contrôle de cette matière première comporte :

1. La mesure des indices physiques,
2. La mesure des indices chimiques,
3. La chromatographie sur couche mince,
4. La chromatographie en phase gazeuse.

INDICES PHYSIQUES.

- Hydrosolubilité : 2,3 p. 1000,
- Densité : $d \frac{20}{20} = 0,960$
- Indice de réfraction : $n \frac{20}{D} = 1,4881$
- Pouvoir rotatoire : $\alpha \frac{20}{D} = 0°$

INDICES CHIMIQUES.

- Indice d'acétylation pyridinée : 69,1
- Indice d'acétylation p-toluène-sulfonique = 159,13.
- Indice de tosylation pyridinée : 182,99.

soit en indices d'estérification :

I.E.A.P. = 19,56
I.E.A.T. = 45,03
I.E.T.P. = 18,12.

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.

Les chromatogrammes obtenus dans les trois solvants S I, S II et S III sont similaires à ceux des essences oxydées elles-mêmes.

Les Rf des spots obtenus sont indiqués dans le tableau XXVI et schématisés figure XIX.

La révélation a été réalisée par le vanillal. On reconnait dans ces chromatogrammes les spots caractéristiques de l'oxydation :

- dans S I le spot jaune de Rf 0,80
- dans S II un spot rose de RF 0,32 et 2 spots jaunes de Rf 0,37 et 0,56.

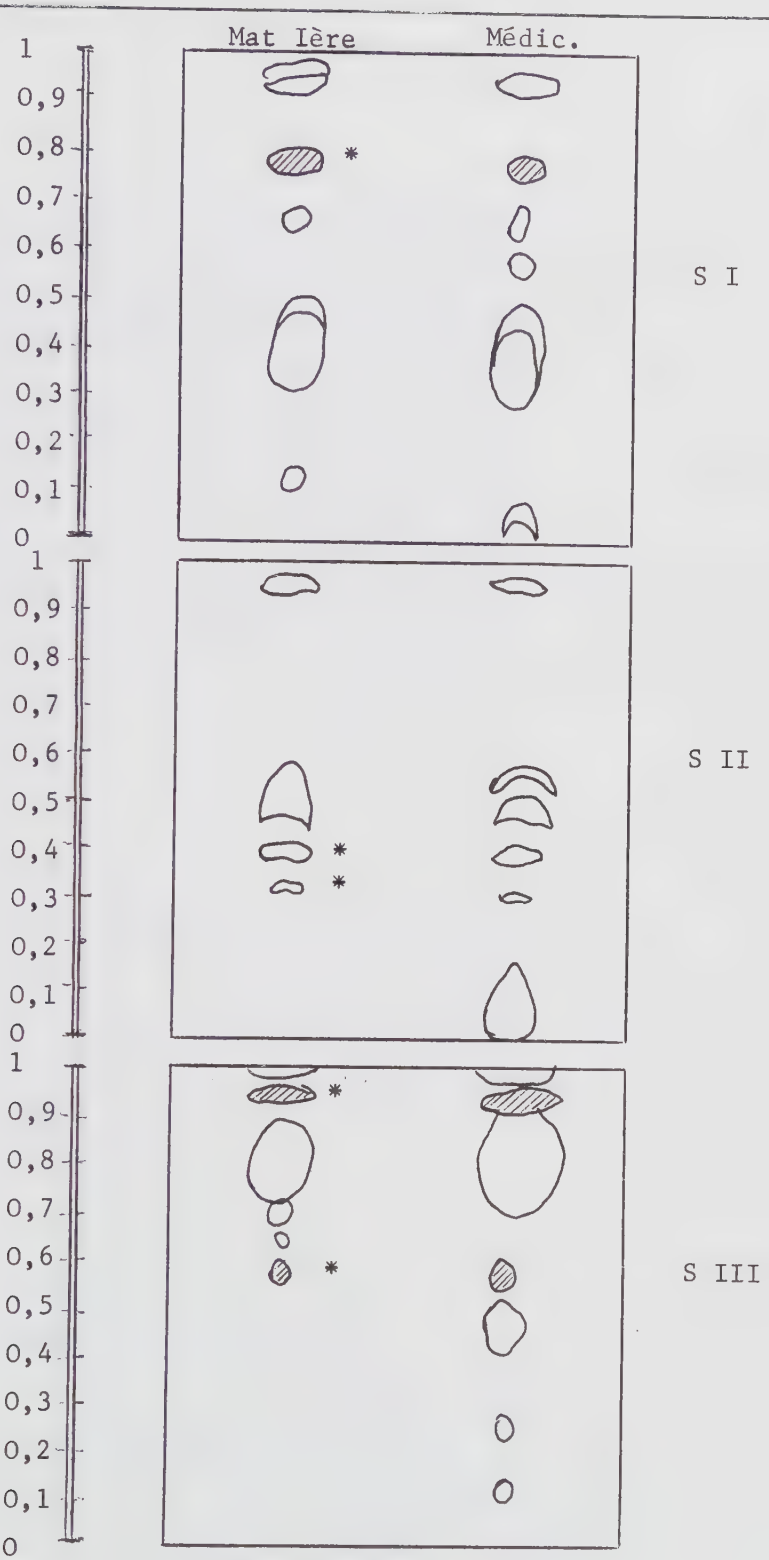
S I	*S II*	*S III*
0,13	traînées	traces 0 - 0,46
	0,32 *	
	0,37 *	
0,42 - 0,50		
	(0,56)*	0,57 *
0,66		0,60
0,80 *		0,81
0,94		0,95 *
0,96	0,97	0,98

Tableau XXVI - Chromatographie du mélange des essences oxydées.

(les chiffres marqués d'un astérisque indiquent les spots caractéristiques de l'oxydation).

La dilution des essences nécessaire pour obtenir les spots de Rf 0,32 et 0,37 dans S II entraîne la disparition des spots de Rf 0,70 à 0,80 .

- dans S III les spots rose de Rf 0,57 et jaune Rf 0,95.



(Révélation = Vanillal)

FIGURE XIX

Chromatographie sur couche mince du mélange des essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus oxydées et des médicaments.
(l'astérisque indique les spots caractéristiques de l'oxydation).

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

Les chromatogrammes obtenus avec le mélange des trois essences oxydées sont représentés figure 20.

On remarque en particulier un certain nombre de pics que nous avons déjà rencontrés lors de l'étude des essences de tR 3 - 11,1 - 13,5 - 14,7 - 18,75 - 21 - 24,14 - 56 - 97.

On reconnaît les pics du pinocarvéol (18,75 - 21) du myrténal (24,14) et de l'hydroxypinocamphone (97). Ils pourront être choisis comme critère d'identification du mélange des trois essences oxydées lors de leur recherche dans les médicaments.

---°---

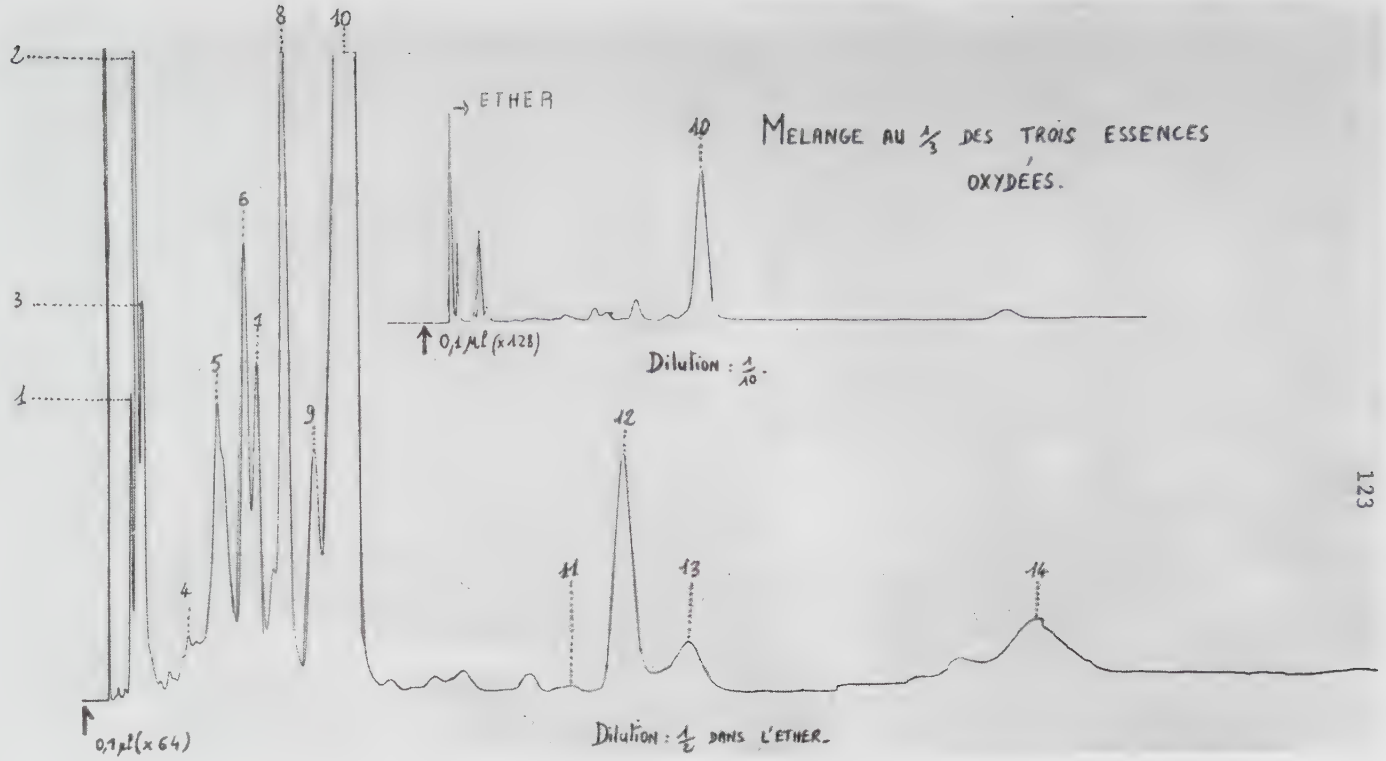


FIG. n° 20 - TEMPS DE RETENTION

1.	2,4	limonène-terpinène	8. 18,7 }		pinocarvéol
2.	3	eucalyptol	9. 21 }		
3.	4	p-cymène	10. 24		myrténal
4.	8,8		11. 41,9		verbénone-carvone
5.	11,		12. 56		
6.	13,5		13. 60		
7.	14,7		14. 97		hydroxypinocamphone

Chapitre III

CONTROLE PHYSICO-CHIMIQUE DES FORMES PHARMACEUTIQUES

Le contrôle physico-chimique des médicaments à base d'essences oxydées nécessite une extraction préalable des principes actifs. Par suite de leur faible quantité, la mesure des indices chimiques s'avère impossible ; par contre la chromatographie sur couche mince et la chromatographie en phase gazeuse nous ont permis de mettre au point des méthodes valables (56).

1. MODALITES D'EXTRACTION.

L'extraction est effectuée sur la solution aqueuse des essences oxydées par le chloroforme en milieu carbonaté sodique.

. Pour les solutés = ampoules, sirop, soluté nasal on extrait directement par le chloroforme .

. Pour les suppositoires : l'extraction chloroformique est précédée d'un entraînement à la vapeur d'eau.

Solutés :

La prise d'essai est de 50 ml pour les ampoules (soit 10 ampoules de 5 ml) et le soluté nasal et de 40 ml pour le sirop.

Ces solutions sont additionnées de carbonate disodique jusqu'à opalescence puis épuisées par 2 x 25 ml de

chloroforme en agitant modérément chaque fois pendant 10 à 15 mn. Après décantation, les couches chloroformiques sont réunies et déshydratées sur sulfate de sodium anhydre. On évapore jusqu'à siccité dans un courant d'air froid. Le résidu est repris par l'éthanol à 95c . ou l'éther pour être chromatographié.

Suppositoires :

La prise d'essai est de 2 suppositoires adultes 4 suppositoires enfants ou 7 suppositoires nourrissons.

Elle est soumise à un entraînement rapide à la vapeur d'eau ; on recueille dans tous les cas 25 ml de distillat .

La solution obtenue est traitée comme précédemment.

II. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.

Le résidu d'extraction est repris par 1 ml d'éthanol à 95 c. dans le cas des solutés et par 2 ml du même solvant pour les suppositoires.

On obtient ainsi une solution titrant théoriquement 5 % du mélange des essences oxydées.

Nous avons chromatographié 10 µl de cette solution dans les trois solvants précédemment utilisés ; la révélation a été effectuée par le vanillal.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure XIX , p. 121.

On obtient dans les trois cas des chromatogrammes proches de ceux que donne la matière première et où l'on note l'existence des spots caractéristiques de l'oxydation.

- spot jaune de Rf 0,80 dans S I
- spots rose de Rf 0,32 et jaune de Rf 0,37 dans S II
- spot rose de Rf 0,57 et spot jaune de Rf 0,95 dans S III ce dernier moins facilement reconnaissable.

On observe de plus l'existence d'un gros spot mauve supplémentaire dans les trois solvants à des Rf différents.

- aux environs de 0,1 dans S I
- au départ dans S II
- à 0,45 dans S III.

Il correspond à la terpine, qui est extraite dans nos conditions opératoires. Comme elle n'est pas entraînée dans les deux premiers solvants, on effectuera le contrôle des formes pharmaceutiques à l'aide du solvant S III de préférence ; la terpine donne alors un spot très reconnaissable et bien séparé de ceux du mélange des essences oxydées.

Par dilution successives de la solution analysée nous avons fixé la limite de détection des spots d'oxydation ; pour un dépot de 10 µl elle se situe aux environs de 2 % en essences oxydées.

III. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

Le résidu d'extraction est repris par 0,5 ml d'éther dans le cas des solutés et 1 ml dans le cas des suppositoires.

On injecte 0,1 µl de cette solution.

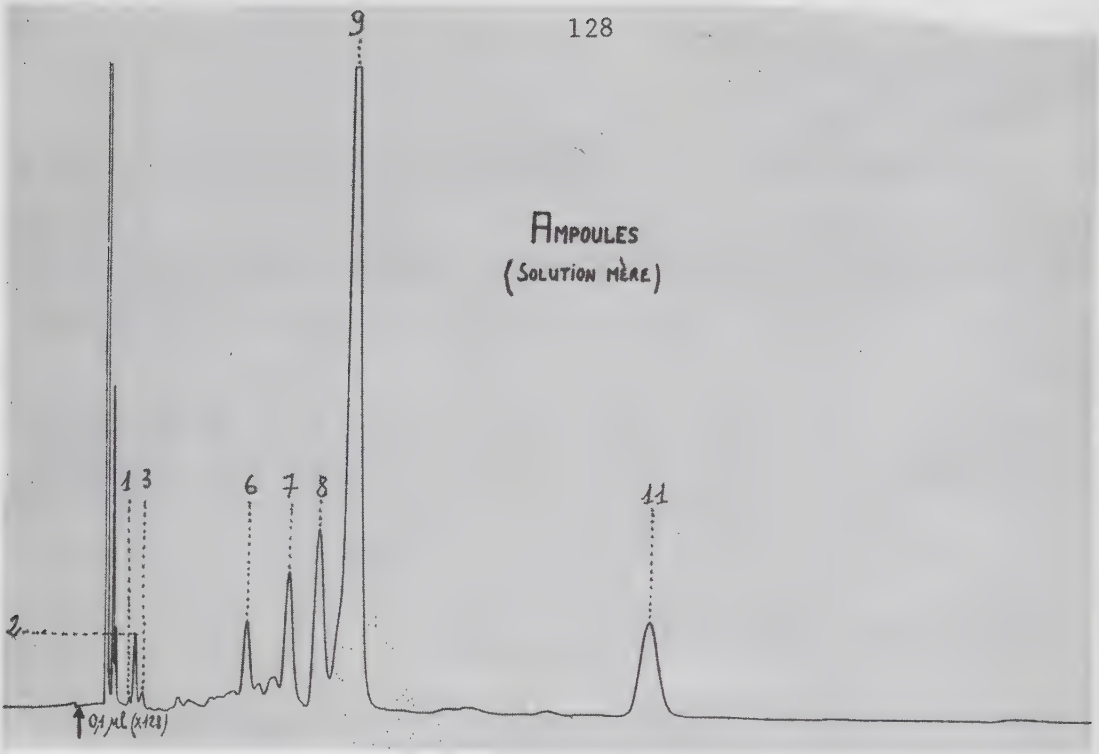
Les chromatogrammes obtenus sont représentés figures 21, 22, 23.

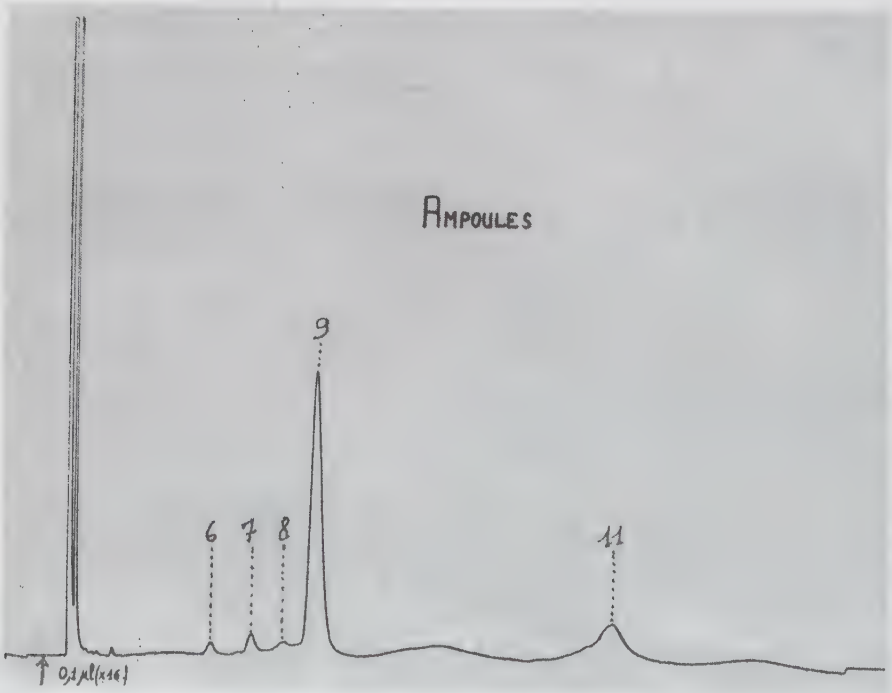
On notera la présence de pics que nous avons signalés lors de l'identification de la matière première. (tR = 21 - 24,14 - 56).

Une extraction effectuée sur une solution plus concentrée (solution mère 7,5g %) a permis d'obtenir un chromatogramme similaire à celui du mélange des essences oxydées, et en particulier le pic de tR = 0,97 que nous n'obtenons pas dans les autres cas.

La détection des pics chromatographies caractéristiques est 100 fois plus sensible que celle des spots décrits en chromatographie sur couche mince.

Les techniques chromatographiques permettent donc d'identifier sans ambiguité les essences oxydées en mélange dans les différentes formes pharmaceutiques.


9
AMPOULES
(SOLUTION MÈRE)
1 3
6 7 8
11
2
0,1 µL (x123)


AMPOULES
9
6 7 8
11
0,1 µl (x116)

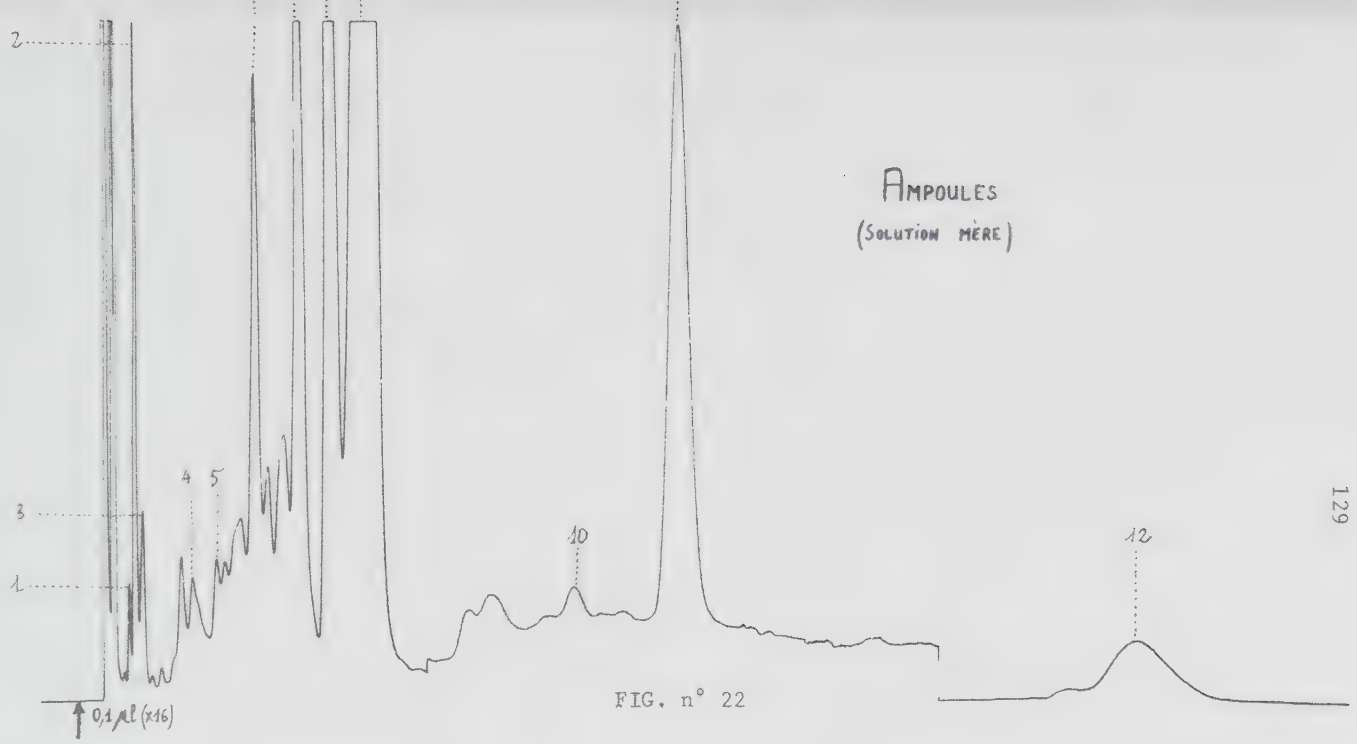


FIG. n° 22

FIG. n° 21 et 22 - TEMPS DE RETENTION

1.	2,4	limonène-terpinène	7. 18,7	pinocarvéol
2.	3	eucalyptol	8. 21	
3.	4	p-cymène	9. 24,2	myrténal
4.	8,8		10. 41,9	verbénone-carvone
5.	11,1		11. 56	
6.	13,5		12. 96	hydroxypinocamphone

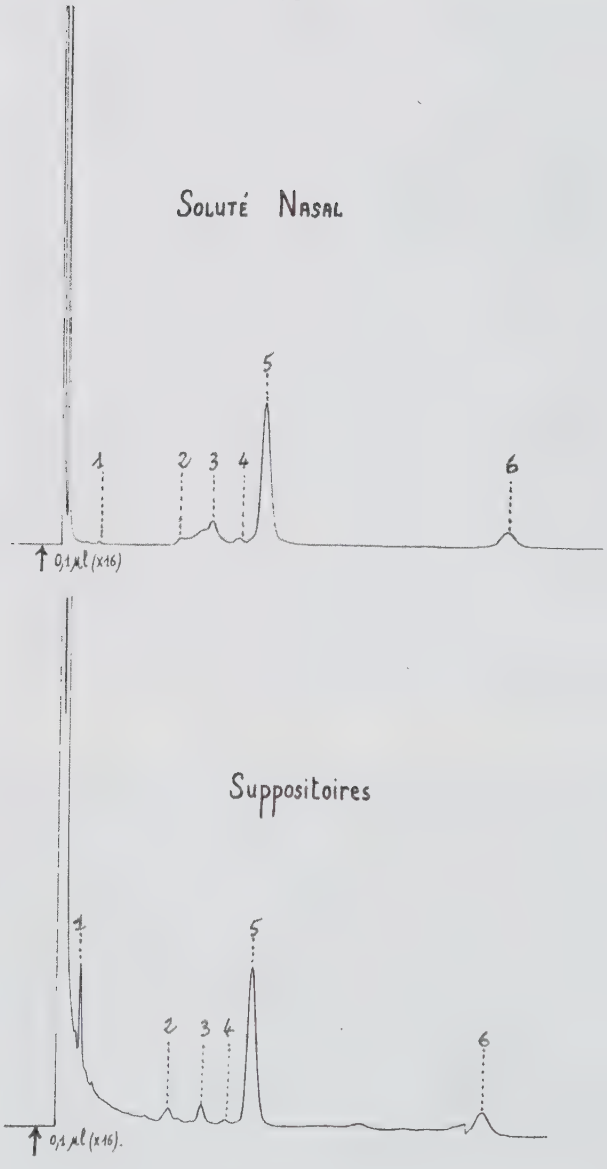


FIG. n° 23

FIG. n° 23 - TEMPS DE RETENTION

1. 3 eucalyptol
2. 13,5
3. 18,7 } pinocarvéol
4. 21 }
5. 24,1 myrténal
6. 54

C O N C L U S I O N S

L'autoxydation catalytique par l'oxygène de l'air, en présence d'abiétate cobaltique, à chaud, améliore la valeur thérapeutique des essences de Pin, de Niaouli et d'Eucalyptus, leurs composants étant transformés en dérivés hydrosolubles.

Nous avons discuté le mode de formation des alcools, cétones, aldéhydes et acides qui prennent naissance au cours de la réaction.

Notre étude a revêtu un double aspect : chimique et analytique ; nous l'avons poursuivie en vue d'une application au contrôle des médicaments.

Nous avons choisi parmi les méthodes analytiques possibles, celles qui nous ont paru le mieux adaptées au but poursuivi :

- méthodes chimiques : mesure de différents indices
- méthodes chromoctographiques : chromotographie en couche mince et chromatographie en phase vapeur.

Les méthodes chimiques nous ont permis de différencier les dérivés fonctionnels formés à la suite de l'oxydation : dérivés acides (augmentation de l'indice acide), dérivés cétoniques (test Brady et indice d'hydroxylamine positifs), dérivés hydroxylés (augmentation des indices relatifs à la fonction hydroxyle).

La comparaison entre les indices d'acétylation pyridinée, d'acétylation p-toluène-sulfonique et de tosylation pyridinées révèle la formation d'une forte proportion d'élcools primaires et secondaires d'une part, et d'alcools tertiaires d'autre part.

L'identification des composés formés dans chaque groupe fonctionnel a été tentée et réalisée par chromatographie en couche mince et par chromatographie en phase vapeur.

Nous avons ainsi identifié dans les essences oxydées, en plus des composants initiaux ayant résisté à l'oxydation, des alcools et des cétones ; pour l'essence de Pin : alcools (transpinovarvéol et alcools isomères, hydroxypinocamphone et isomères, myrténol en faible quantité) cétones (verbénone, carvone, hydroxypinocamphone) ; pour les essences de Niaouli et d'Eucalyptus, alcools (transpinocarvéol et alcools isomères, hydroxypinocamphone) cétones (verbénone et carvone) en moindre proportion.

Les essences autoxydées par simple contact avec l'oxygène de l'air, à la température ordinaire sans catalyseur, contiennent les mêmes dérivés d'oxydation.

L'étude d'essences autoxydées catalytiquement ou non, plus ou moins anciennes, nous a permis de suivre l'évolution de l'oxydation dans le temps; la formation d'alcools précède celle des aldéhydes et des cétones.

Quel que soit le mode d'oxydation nous avons noté, dans tous les cas une augmentation de la teneur en p-cymène.

La faible proportion des α et β-pinènes dans les essences de Pin nous explique qu'elles ne contiennent après oxydation que peu de verbénone et de carvone, dont la présence pourrait être rapportée au limonène et au terpinolène .

Le Δ_3-carène, subit outre une autoxydation, une isomérisation en différents carbures terpéniques et donne lui aussi du p-cymène.

Les études chromatographiques nous ont montré d'autre part que tous les carbures s'oxydent très rapidement à l'air.

Nous avons appliqué les méthodes qui viennent d'être décrites à l'analyse des médicaments. Elles rendent possible et aisée la différenciation entre les essences d'origine et les essences oxydées.

En ce qui concerne les formes galéniques, la très faible proportion de dérivés oxydés qu'elles contiennent interdit l'utilisation des méthodes chimiques, autrement dit la détermination des indices.

Nos essais ont porté sur : un sirop, un soluté nasal, un soluté injectable, des suppositoires, par chromatographie sur couche mince et par chromatographie gaz-liquide. Après extraction des principes actifs, nous avons pu identifier en plus des composants des essences d'origine, les composés suivants : myrténol, myrténal, trans-pinocarvéols, hydroxypinocamphone.

Nous disposons ainsi d'une méthode de contrôle physico-chimique des médicaments à base d'essences oxydées.

---°---

B I B L I O G R A P H I E

1. APPLETON R.A. & Mc CORNICK A. - Tetrahedron G.B., 1968, 24, 2, 633-7.
2. ATTAWAY J.A. et Coll. - Anal. Chem., 1965, 37, 1289.
3. BADOCHE M. - Bull. Soc. Chim. Fr. , 1953, 20, 764-766.
4. BARDYSHEV I.I., KULIKOV V.I., CHEMRUK L.S. - Dokl. Akad. Nauk., B.S.S.R., 1968, 12, 6, 534-8.
5. BARDYSHEV I.I. &KULIKOV V.I. - Zh. Anal. Khim S.S.S.R., 1968, 23, 7, 1081-4.
6. BARDYSHEV I.I. , KOSNIKOVA L.V. & PERCOVSKIJ A.C. Vesci Akad. Navuk B.S.S.R., Khim Navuk, 1968, 3, 108-110.
7. BEREZKIN V.G. & PAKHOMOV V.P. - Izvest. Akad. Nank. S.S.S.R. Ser. Khim., 1968, 4, 791-3.
8. BERTUCAT M. - Thèse Doct. Pharmacie (Etat), Bordeaux, 14 févr. 1957.
9. BLUMANN A. & ZEITSCHEL O. - Ber. Dtsh. Chem. Ges., 1913, 46, 1178.

10. BOBER H.& BURNER K. - Z.(Fresenius)Anal. Chem. Disch. 1968, 238, 1, 1-19.

11. BOULEZ V. - Bull. Soc. Chim. France, 1907, 1, 117; 1924, 35, 419.

12. BRADY O.L. - J. Chem. Soc., 1931, 756.

13. BRUNEL - Traité de Chimie Végétale, Frère Ed., Tourcoing, 1948.

14. BRUS G., BENTEJAC R.& PREVOT F. - Ann. Fals. Exp. Chim., 1968, 61, 681, 233-48.

15. BRYANT W.M.D. & SMITH D.M. - J. Amer. Chem. Soc., 1935, 57, 57.

16. BÜNAU G. Von, SCHADE G. & GOLLNICK K. - Z.(Fresenius) Anal. Chem. Disch., 1967, 227, 3, 173-87.

17. BÜNAU G. Von, SCHADE G. & GOLLNICK K. - Z.(Fresenius) Anal. Chem. Disch., 1967, 227, 4, 270-8.

18. CALVARANO I. - Essenze dem. Agrum. Ital., 1960, 30, 2, 109-22.

19. DELABY R. & SABETAY S. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1935, 2, 1716.

20. DUPONT G.& ALLARD J. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1930, 47, 942.

21. DUPONT G. & ALLARD J. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1930, 47, 1216.

22. DUPONT G. & CROUZET J. - Bull. Inst. Pin, 1929, 58, 101-108.

23. DUPONT G., DULOU R. & MONDOU O. - Bull. Soc. Chim. Fr. 1953, 20, 60-61.

24. DUPONT G. & ZACHAREWICZ W. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1935, 2, 533.

25. FILLIATRE C. - Thèse doct. Sci. Phys., Bordeaux, 1969.

26. FIORE - Givaudanian, déc. 1937, 5.

27. GAIFFE A.& CASTANET J. - C.R. Acad. Sci. C. Fr., 1970, 270, 1, 63-66.

28. GARCIA VALEJO M.C. et Coll. - Parfum. Cosmet. Savons, Fr., 1969, 12, 1, 26-35.

29. GEYER S. & MAYER R. - Z. Chem., 1965, 5, 308.

30. GIBIRILA B.O. - Thèse doct. Pharmacie (Etat), Bordeaux, 1963.

31. GLICHITCH L.S. - Bull. Soc. Chim., 1923, 33, 1284.

32. GODON M. - Thèse Doct. Pharmacie (Etat), Paris, 1963.

33. GOLLNICK K., BÜNAU G. Von & SCHADE G. - Z.(Fresenius) Anal. Chem. Disch., 1969, 244, 1, 7-17.

34. GOLSE J. - Précis de Matière Médicale, G. Doin et Cie Editeur, Paris, 1955.

35. GRIGNARD V., DUPONT G. & LOCQUIN R. - Traité de Chimie Organique, Masson Editeur, Paris, 1949, Tome XVI, 145.

36. HELLYER R.O., Mc KERN H.H. - J. Proc. Roy. Soc. N.S. Wales, 1955, 89, 188-193.

37. HEROUT V. Von - Planta Med. Allem., 1967, supplément
38 67-68, 68-78.

39. HOLNESS D. - Analyst., 1964, 89, 1065, 763-7.

40. ISOGULJANZ & SMOLJANINOVA - Riechstoffind., 1933, 8, 194.

41. KALSI P.S. - Perfum. Essent. Oil Rec., G.B., 1968, 59, 6, 437-8.

42. KAZARINOU N.A. & DZUBA N.P. - Pharmacija S.S.S.R., 1967, 16, 2, 52-54.

43. KHAFAGY S.M. & MNAJED H.K. - Acta Pharm. Suecica, 1968, 5, 155-162.

44. KLEIN E. & SCHMIDT W. - Dragoco Report, 1969, 3, 43-50.

45. LALANDE R. & FILLIATRE C. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1962, 792-95.

46. LAWRENCE B.M. - J. Chrom. Netherl., 1968, 38, 4, 535-7.

47. LEMAN A. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1944, 11, 355 ; 1945, 12, 540 et 908 ; 1946, 13, 205.

48. LLOYD H.A. & FALES H.M. - Tetrahedron Letters, G.B., 1967, 48, 4891-5.

49. MADEIRA COSTA M.M. - Rev. Portug. Quim., 1967, 9, 3, 129-38.

50. MASSE J. (Mlle) & PARIS R. - Ann. Pharm. Fr., 1964, 22, 5, 349-60.

51. MATSUURA T. - Bull. Nat. Inst. Sci. India, 1968, 37, 83-9.

52. MESNARD P. & BERTUCAT M. - Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1955, 94, 148 ; 1956, 95, 25.

53. MESNARD P. & BERTUCAT M. - Pharmacia Mediterranea, 1958, 2, 52-59.

54. MESNARD P. & BERTUCAT M. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1959, 307.

55. MESNARD P. & BERTUCAT M. - C.R. XXI Congrès Sciences Pharm., Pise, 1961, 694 ; Boll. Chim. farm., 1962, 101, 519.

56. MESNARD P. & CHAPARD C. - Toulouse Pharm., 1967, 14, 1, 59-63.

57. MESNARD P., DEVAUX G., BERTUCAT M., TRARIEUX R. & GIBIRILA B.O. - Scientiae Pharmaceuticae, 1967, II, 263. (Proceedings of the 25th congress of Pharmaceutical Sciences, Prague, 24-27, august 1965, Butterworths, London).

58. MESNARD P., GIBIRILA B.O. & BERTUCAT M. - Chimie Analytique, 1963, 45, 491 ; C.R. Acad. Sci., 1963, 257, 2999.

59. MONTAUDON E., FRANCOIS H. & LALANDE R. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1969, 2773-8.

60. NAVES Y.R. - Helv. Chim. Acta, 1944, 27, 1626 ; 1947, 30, 796-800 ; 1947, 30, 1613-1615.

61. PARIS R. & GODON M. - Ann. Pharm. Franç., 1961, 19, 2, 86-93.

62. PARIS R. & GODON M. - Recherche France, 1963, 13, 48-77.

63. PETOU G.M. & SHCHERBAKOUA K.O. - London Inst. Petroleum, 1967, 25, 5-16, 50-6.

64. RIJKENS F. - Parf. Cosm. Sav., 1969, 12, 2, 72-78.

65. ROBERTS D.R. - J. Gas. Chromatography U.S.A., 1968, 6, 12, 126-7.

66. RUDLOFF E. Von & SOOD V.K. - Canad. J. Chem., 1969, 47, 2081-7.

67. SABETAY S. - C.R. Acad. Sci., 1934, 390, 1419.

68. SCHANTZ M. Von - Planta Med., 1968, 16, 12, 395-403.

69. SCHANTZ M. Von, JUVONEN S., OKSANEN A. & HAKAMAA I. - J. Chromatogr. Netherl., 1968, 38, 3, 364-72.

70. SCOTT E.J.Y. - Amer. Chem. Soc. Div. Petroleum Chem. prepr., 1969, 14, n° 4, C 85 - C 97.

71. SHAKUNTHALA A.P., PATHY M.S.V. - J. Electroanal. Chem., 1967, 14, 1, 123-5.

72. SICKLE Van D.E., MAYO F.R., ARLUCK R.M. & SYZ M.G. - J. Amer. Chem. Soc., 1967, 89, 967.

73. SUSINI M. - Thèse Doct. Univ. mention Sci., Paris, 1967.

74. TER HEIDE R. - Z. (Fresenius) Anal. Chem. Disch., 1968, 236, 215-27.

75. THIES H., SCHUSTER G. - Dtsche Apotheker Ztg, 1968, 108, 42, 1608-14.

76. TRARIEUX R. - Brevet de Procédé n° 1.375.829 du 14 Août 1963.

77. TRARIEUX R. - Brevet de Médicaments n° P.V. 958 640 du 27 décembre 1963.

78. TRARIEUX R. - Communication aux journées de Chimie thérapeutique, Strasbourg, 4 juillet 1966 (non publié).

79. VALENTE SOARES M.I. & SANTOS PEREIRA P.G. - Rev. Portug. Quim., 1969, 11, 1-4, 26-33.

80. VERLEY A. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1928, 43, 1287.

81. VERLEY A., BOELSING - Ber., 1901, 34, 3354.

82. VERNIN G. - Parf. Cosm. Sav., 1969, 12, 4, 179-88.

83. VILLENAVE J.J., FRANCOIS H. & LALANDE R. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1970, 599-606.

84. ZUBYK W.J. & CONNER A.Z. - Anal. Chem., 1960, 32, 8, 912-917.

EDITIONS BERGERET
2, rue Bergeret
BORDEAUX

Tél. 91.12.59

DEUXIEME THESE

Proposition donnée par la Faculté

LE DICHROISME CIRCULAIRE

SES APPLICATIONS ANALYTIQUES